

**Physikochemische und biochemische
Mechanismen in der Plasmamembran zur
Kontrolle des Clusterverhaltens des
T-Zell-Rezeptors**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jan Niklas van Üüm

aus

Siegburg

Bonn 2013

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter

Herr Prof. Dr. Thorsten Lang

2. Gutachter

Herr Prof. Dr. Christoph Thiele

Tag der Promotion:

21.01.2014

Erscheinungsjahr:

2014

Erklärung

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Lauria, I.*; **van Üüm, J.***; Mjumjunov-Crncevic, E.; Walrafen, D.; Spitta, L.; Thiele, C. & Lang, T. (2013): GLTP Mediated Non-Vesicular GM1 Transport between Native Membranes, *PLoS ONE* **8**, e59871.

* Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen.

INHALTSVERZEICHNIS

1 KURZFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Die Plasmamembran – Vermittler zwischen zwei Welten	3
2.1.1 Lipide der Plasmamembran	4
2.1.2 Proteine der Plasmamembran	7
2.1.3 Modelle zur Organisation von Membranen	9
<i>Fluid-Mosaic-Modell</i>	10
<i>Picket-Fence-Modell</i>	11
<i>Membrane-Raft-Modell</i>	12
Modell der Clusterbildung durch spezifische Protein-Protein- Wechselwirkungen	13
Modell des elektrostatischen Proteincusterwachstums	16
<i>Protein-Island-Modell</i>	17
2.2 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR): Rezeptor mit verschiedenen Organisationsgraden	20
2.2.1 T-Zellen und der TCR im Kontext des Immunsystems	20
2.2.2 Aufbau des TCR	21
2.2.3 Intrazelluläre Signalkaskaden nach TCR-Aktivierung	23
2.2.4 Nanocluster, Mikrocluster und die Immunologische Synapse	27
TCR-Nanocluster	27
TCR-Mikrocluster	28
Die Immunologische Synapse	30
2.2.5 Modelle der T-Zell-Aktivierung	33
Kinetisches Korrekturlesemodell (<i>kinetic proofreading</i>)	34
Seriellles Aktivierungsmodell (<i>serial triggering</i>)	35
Kinetisches Segregationsmodell	35
<i>Lipid-(Membrane)-Raft-Modell</i>	36
Korezeptor- und Pseudodimerisierungsmodell	37
Kraft- bzw. Liganden-induzierte Konformationsänderung	38
3 ZIELSETZUNG	40

4 MATERIAL UND METHODEN	42
4.1 Materialien	42
4.1.1 Mikroskopie und Zubehör	42
Mikroskope	42
Zubehör	43
Deckgläser	43
4.1.2 Pufferlösungen	43
4.1.3 Zellkulturmedien	46
4.1.4 Antikörper	48
Primäre Antikörper	48
Sekundäre Antikörper	49
4.1.5 Zelllinien	50
4.1.6 DNS-Konstrukte (nicht selbst erstellt)	51
4.1.7 Verwendete Kits	52
4.2 Methoden	53
4.2.1 Klonierung	53
Fluoreszenzmarkierte CD3-Konstrukte	53
ICAM1-Konstrukte	55
GLTP-Konstrukte	57
mCherry-tSH2(ZAP70)-Konstrukt	58
4.2.2 Behandlung von Deckgläser	58
Hydroxylierung der Glasoberfläche durch <i>Piranha Solution</i>	58
Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin (PLL)	59
Beschichtung von Deckgläsern mit aktivierenden Antikörpern	59
4.2.3 Zellkultur	60
Einfrieren und Auftauen von Zellen	60
Passagieren von Zellen	60
Transfektion von Zellen	61
4.2.4 Herstellung von <i>Membrane Sheets</i>	61
4.2.5 Inkubation von <i>Membrane Sheets</i> mit Ca^{2+}	62
4.2.6 GM1-Färbung mit Cholera toxin B (CTX)	63
4.2.7 Glykolipiddepletion mit GLTP	63
4.2.8 GM1-Beladung mit GLTP	63
4.2.9 Glykolipidtransfer zwischen nativen Membranen mit GLTP	64
4.2.10 pH-abhängige Verschiebung des GFP-Anregungsspektrums	65
4.2.11 Immunfärbungen von <i>Membrane Sheets</i>	65

4.2.12 Proteinbestimmung	66
4.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) Coomassie Färbung und Western Blot.....	66
4.2.14 Proteinaufreinigungen	67
Proteinaufreinigung von ICAM1 aus einer Zelllinie	67
Proteinaufreinigung von GLTP aus Bakterien	69
4.2.15 Erstellung einer <i>Supported Lipid Bilayer</i> (SLB).....	70
Aktivierung von Jurkat E6.1 auf einer SLB.....	72
Herstellung von <i>Membrane Sheets</i> auf einer SLB	73
4.2.16 Mikroskopie	73
Epifluoreszenzmikroskopie	73
<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> (TIRF)-Mikroskopie	74
Konfokale Mikroskopie	74
<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP) mit Berechnung von Diffusionskoeffizienten	75
4.2.17 Analysemethoden von Mikroskopiebildern.....	76
Quantitative Analyse von Fluoreszenzintensitäten.....	76
Clustergradanalyse.....	77
Kokolisierungsanalyse	78
Verteilungsanalyse von Intensitäten in einer <i>Membrane Sheets</i> - Population.....	79
Streudiagramm (<i>scatter plot</i>)	80
5 ERGEBNISSE.....	81
5.1 Clusterverhalten des TCR in unterschiedlichen Aktivierungszuständen	83
5.1.1 TCR-Cluster in nicht-aktivierten und aktivierten T-Zellen auf immobilen Oberflächen.....	83
5.1.2 TCR-Cluster in aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen auf mobilen Oberflächen.....	87
Proteinaufreinigung von ICAM1	89
Erstellung einer mobilen Oberfläche in Form einer <i>Supported Lipid</i> <i>Bilayer</i>	92
Aktivierung von Jurkat T-Zellen auf einer <i>Supported Lipid Bilayer</i>	97
5.2 Bedeutung zytosolischer CD3ζ-Domänen und deren Interaktionspartner für das TCR-Clustern	105
5.2.1 Intrazellulär verkürzte CD3 ζ -Mutanten	105

Sortierung von GFP-markiertem CD3 ζ -WT in die membranständigen TCR-Cluster.....	108
Clusterverhalten von CD3 ζ mit deletierten intrazellulären Domänen	110
5.2.2 Einfluss von Ca ²⁺ auf das Clustern des TCR in der Plasmamembran von T-Zellen unterschiedlicher Aktivierungszustände	114
5.3 Rolle von Glykolipiden bei dem Clusterverhalten des TCR	118
5.3.1 Das Lipidtransferprotein GLTP.....	118
5.3.2 Veränderte Glykolipidlevel beeinflussen den TCR.....	132
5.4 Abhängigkeit der TCR-Lokalisierung von der extrazellulären CD3ζ-Domäne.....	138
6 DISKUSSION	151
6.1 Verwendung von GLTP zur Veränderung der Glykolipidzusammensetzung in nativen Membranen	153
6.1.1 GLTP als Werkzeug zur Veränderung von Glykolipidleveln in Membranen	154
6.1.2 Implikation für die physiologische Relevanz von GLTP in Zellen	158
6.2 Herstellung einer funktionalen, mobilen Oberfläche zur T-Zell-Aktivierung	160
6.2.1 Verwendung einer <i>Supported Lipid Bilayer</i> zur Initiation einer Immunologischen Synapse	161
6.2.2 Initialisierung von TCR-Mikroclustern und Ausbildung einer IS	165
6.3 Abhängigkeit des TCR-Clusterverhalten von den ITAM-Domänen, dem Glykolipidspiegel und der Ca²⁺-Konzentration in unterschiedlichen Aktivierungszuständen	171
6.3.1 Struktur und Abhängigkeiten der TCR-Nanocluster.....	172
Nachweis der Nanocluster.....	172
Nanocluster sind unabhängig von den ITAM-Domänen	173
Die Lipidumgebung beeinflusst die Nanocluster	175
Ladungseinfluss von Ca ²⁺ auf die Nanoclustergröße	178
6.3.2 TCR-Mikrocluster	179
Mikrocluster bilden sich ITAM-unabhängig	180
Die Lipidumgebung wechselwirkt mit den TCR-Mikroclustern	181
Ladungseinfluss von Ca ²⁺ auf Mikrocluster	182

6.3.3 Die Bedeutung der extrazellulären CD3 ζ -Domäne im TCR.....	183
Mechanoaktivierung als mögliche Erklärung für die veränderte	
Lokalisierung durch Internalisierung des TCR	185
6.3.4 Zusammenfassung und Modell der TCR-Aktivierung	188
 7 LITERATURVERZEICHNIS	193
 8 DANKSAGUNG.....	213
 9 ANHANG.....	215

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Membranlipidklassen	5
Abbildung 2	Lipidasymmetrie der Plasmamembran von Erythrozyten	6
Abbildung 3	Verschiedene Arten von peripheren und integralen Membranproteinen	8
Abbildung 4	Das <i>Fluid-Mosaic</i> -Modell	10
Abbildung 5	Das <i>Picket-Fence</i> -Modell	11
Abbildung 6	Das <i>Membrane-Raft</i> -Modell	13
Abbildung 7	Modell eines dicht gepackten Proteinclusters	15
Abbildung 8	Modell elektrostatisch-vermittelten Clusterwachstums	17
Abbildung 9	Das <i>Protein-Island</i> -Modell	18
Abbildung 10	Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR)	22
Abbildung 11	TCR-assoziierte intrazelluläre Signalwege	26
Abbildung 12	Nanocluster- und Mikroclusterbildung	29
Abbildung 13	Die Struktur der Immunologischen Synapse	30
Abbildung 14	Die Immunologische Synapse als Ort der TCR-Internalisierung	32
Abbildung 15	Das Kinetische Korrekturlesemodell	34
Abbildung 16	Das Kinetische Segregationsmodell	36
Abbildung 17	Das <i>Lipid-Raft</i> -Modell	36
Abbildung 18	Das Korezeptor- und Pseudodimerisierungsmodell	37
Abbildung 19	Modelle zur TCR-Aktivierung durch Konformationsänderungen	38
Abbildung 20	Expressionsvektorkarte für Säugetierzellen und repräsentatives Konstrukt	54
Abbildung 21	Vektorkarte und Schema zu dem ICAM1- Δ TMR-mEGFP-Xa-8xHis Konstrukt	56
Abbildung 22	Vektorkarte und Schema zu dem 6xHis-Thrombin-GLTP-Konstrukt	57
Abbildung 23	Bestandteile der Perfusionskammer (Biotech FCS2)	72

Abbildung 24	Inaktive T-Zellen zeigen geclusterten TCR, aktivierte Zellen zeigen Mikrocluster und Polarisierung des TCR	86
Abbildung 25	Schema einer aktivierenden <i>Supported Lipid Bilayer</i>	88
Abbildung 26	Expression und Aufreinigung des Adhäsionsmoleküls ICAM1	91
Abbildung 27	Optimierung des Erstellungsprozesses einer <i>Supported Lipid Bilayer</i>	94
Abbildung 28	Das Diffusionsverhalten von Komponenten der erstellten <i>Supported Lipid Bilayer</i> ist vergleichbar mit SLB-Systemen, die Immunologische Synapsen induzieren	97
Abbildung 29	Unvollständige Segregation von ICAM1 und α TCR nach Jurkat T-Zellkontakt	100
Abbildung 30	Zentrale Aggregationen des TCR (cSMACs) konnten auch nach langer Inkubation nur extrem selten beobachtet werden	102
Abbildung 31	Die Herstellung von <i>Membrane Sheets</i> aus Jurkat E6.1 T-Zellen ist auf mobilen Oberflächen möglich	104
Abbildung 32	mEGFP-markiertes CD3 ζ und ITAM-Deletionsmutanten von CD3 ζ werden in vorhergesagter Größe als Dimere exprimiert	108
Abbildung 33	Kolokalisierung von CD3 ζ -WT mit anderen Bestandteilen des TCR	110
Abbildung 34	Clustern und Lokalisierung von CD3 ζ und dessen Deletionsmutanten in Jurkat E6.1 T-Zellen	112
Abbildung 35	Kolokalisierung von CD3 ζ -WT mit Deletionsmutanten	114
Abbildung 36	Ca ²⁺ hat keinen Einfluss auf das Clustern von CD3 ζ in der Plasmamembran von aktivierten und naiven Jurkat-Zellen	117
Abbildung 37	Aufreinigung des Lipidtransferproteins (LTP) GLTP	121
Abbildung 38	GLTP kann Glykolipide in native Membranen spezifisch inserieren und sowohl aus artifiziellen wie auch aus nativen Membranen zeit- und konzentrationsabhängig depletieren	126
Abbildung 39	GM1-Transport durch GLTP ist abhängig von der GM1-Konzentration der Donor- und Akzeptor-Membran	130

Abbildung 40	GM1-Level verändern das Clusterverhalten von Proteinen	132
Abbildung 41	Veränderung des TCR-Clusters bei veränderter Membranzusammensetzung (Glykolipid-Depletion)	135
Abbildung 42	Abhängigkeiten zwischen TCR-Clustern und nativem GM1-Membrangehalt	137
Abbildung 43	Eine große extrazelluläre Domäne von CD3 ζ führt zur verstärkten zytosolischen Lokalisierung	140
Abbildung 44	Die exakte extrazelluläre Aminosäure-Sequenz von CD3 ζ ist irrelevant für Lokalisierung und Aktivierung des TCR	142
Abbildung 45	Verkürzung der kleinen extrazellulären Domäne führt schrittweise zu mikrocluster-ähnlichen Strukturen mit Anteilen an vesikulärer Lokalisierung	144
Abbildung 46	Veränderte Lokalisierung des TCR beruht auf Endozytose	148
Abbildung 47	Veränderte Lokalisierung des TCR durch CD3 ζ - Δ EC ist nicht ITAM-bedingt	150

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CAP-PE	1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(cap biotinyI)
CCD	<i>charged coupled device</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i> - konfokales Laser-Raster Mikroskop
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DGS-NTA(Ni)	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl]</i> (Nickel Salz)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DPTA	1,3-Diamino-2-propanol-N,N,N',N'-tetraessigsäure
DRM	<i>detergence resistant membrane</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FCS	fötales Kälber Serum
FRAP	<i>fluorescence recovery after photo-bleaching</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
Glc	Glukose
GLTP	<i>Glycolipid Transfer Protein</i>
GM1	monosialotetrahexosylgangliosid
hIR	humaner Insulinrezeptor
Hz	Hertz
mEGFP	monomeres <i>enhanced</i> (verbessertes) Grün Fluoreszierendes Protein
mGFP	monomeres Grün Fluoreszierendes Protein
min	Minute
ms	Millisekunde
p. a.	<i>pro analysis</i>
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
PLL	Poly-L-Lysin
Rec _{Max}	<i>maximal recovery</i> – Maximale Fluoreszenzrückkehr
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
Std	Stunde
T _{1/2}	Halbwertszeit
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TMA-DPH	1-(4-Trimethyl-Ammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien-p-Toluolsulfonat

TMR	Transmembranregion
ORF	<i>open reading frame</i> – offenes Leseraster
ÜN	über Nacht
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

1 Kurzfassung

Die Plasmamembran als Vermittlerin zwischen Zellinnerem und umgebender Umwelt ist eine wichtige Struktur der Zelle, deren Organisationsprinzipien nur ansatzweise verstanden sind. Membranproteine erfüllen essentielle Aufgaben der Plasmamembran und lagern sich dabei zu zweidimensionalen Komplexen mit intra- und extrazellulären Interaktionen zusammen.

Ein Beispiel hierfür ist der T-Zell-Rezeptor, der eine Schlüsselrolle bei der T-Zell-Aktivierung im adaptiven Immunsystem einnimmt. Er bildet Cluster mit variabler, aktivierungsabhängiger Größe aus und einige seiner Teile können an Lipide gebunden sein. Als Folge seiner Aktivierung finden massive Veränderungen in der Membran- und Zellarchitektur statt. Dies macht den TCR zu einem interessanten Modellprotein um die Organisationsprinzipien der Plasmamembran zu erforschen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit systematisch untersucht, welche Einflüsse beim TCR-Clustern in unterschiedlichen Aktivierungszuständen entscheidend sind.

Abhängig vom Aktivierungszustand ist der TCR-Komplex hauptsächlich über seine konstitutive Komponente CD3 ζ mit Interaktionspartnern assoziiert und bildet Mikrocluster aus. Deshalb wurde getestet welche Bedeutung die CD3 ζ -Domänen für das TCR-Clusterverhalten haben. Weiterhin wurde der Einfluss von verschiedenen biochemischen und physikochemischen Parametern, wie die Glykolipidkonzentration innerhalb der Plasmamembran oder die Konzentration des *second messengers* Ca²⁺, auf das TCR-Verhalten untersucht.

Dazu wurden verschiedene mikroskopische Techniken an ganzen Zellen wie auch an Plasmamembranpräparationen angewandt. In diesem Zusammenhang wurde ein biochemisches Werkzeug zur unmittelbaren und

massiven Veränderung des Glykolipidspiegels von nativen Plasmamembranpräparationen entwickelt. Desweiteren wurden ein *Supported-Lipid-Bilayer*-System als dynamische, aktivierende Oberfläche zur T-Zell-Aktivierung etabliert.

Die vorgenommenen Untersuchungen zeigten eine ITAM-unabhängige Ausbildung von Nano- und Mikroclustern, geringe Reduktion des TCR-Clustergrades bei verringertem Glykolipidspiegel und keinen Einfluss erhöhter Ca^{2+} -Konzentration auf die TCR-Cluster. Dabei war die Reduktion bei vermindertem Glykolipidspiegel wahrscheinlich eher auf eine allgemeine Veränderungen der biochemischen Eigenschaften der Plasmamembran zurück zu führen als auf eine aktive, unmittelbar Wirkung auf den TCR. Durch das Ausbleiben eines Ca^{2+} -Effektes auf den TCR konnte die Akkumulation negativer Ladungen als größenbeschränkender Faktor für TCR-Cluster ausgeschlossen werden, da die Beschränkung durch die Ca^{2+} -Ionen aufgehoben worden wären.

Die Studien zum extrazellulären Teil von CD3 ζ wiesen nach, dass trotz hoher Konservierung der Aminosäureabfolge, nur die Länge des Peptids Einfluss auf die Lokalisierung des TCR hat. Die Internalisierung der extrazellulär-deletierten CD3 ζ -Mutanten deutete darauf hin, dass eine dominante CD3 ζ -Mutante vorlag, die zur konstitutiven T-Zell-Aktivierung führte. Durch das Fehlen der extrazellulären CD3 ζ -Domäne kam es zur Konformationsänderung im TCR wie sonst durch Bindung eines Liganden (Modell der Kraft-induzierten Konformationsänderung (van der Merwe & Dushek 2011; Blanco & Alarcón 2012)). Dies führte zur Aktivierung der T-Zelle und resultierte in einer Internalisierung des Rezeptors.

Als Fazit ist zu sagen, dass das TCR-Clustern robust gegenüber äußeren biochemischen und physikochemischen Einflüssen ist und vielmehr durch konformationsabhängige spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen reguliert wird.

2 Einleitung

Der menschliche Körper ist die Summe des Wechselspiels von spezialisierten Organen, die festgelegte Aufgaben erfüllen. Die Funktion der Organe ergibt sich aus ihrer Architektur und Zusammensetzung. Dabei setzen unterschiedliche Gewebetypen aus speziellen Zelltypen die Organe zusammen. Wesentlich für die Definition und das Funktionieren von Organen und Geweben ist die Abgrenzung gegen die Umgebung, ohne die ihre Spezialisierung nicht möglich wäre.

Die definierte Begrenzung eines abgeschlossenen Reaktionsraums von der umgebenden Umwelt ist generell für die Existenz belebter Materie essentiell. Während die unbelebte Umwelt einem Zustand des Ausgleichs und der Entropiemaximierung entgegen strebt, können im abgeschlossenen Inneren von lebenden Zellen gerichtete Stoffwechselreaktionen, Homöostase und definierte Informationsweitergabe (in Form von DNS) entstehen. Um das Überleben zu gewährleisten, muss die begrenzende Plasmamembran zusätzlich zur Abtrennungsfunktion eine Vielzahl weiterer Aufgaben leisten (z. B. Signalvermittlung, Stofftransport, Adhäsion etc.).

2.1 Die Plasmamembran – Vermittler zwischen zwei Welten

Die Plasmamembran (auch Zellmembran genannt) ist ein hochspezialisiertes zweidimensionales Kompartiment der Zelle. Das intrazelluläre Zytosol wird durch sie begrenzt und in einer Zusammensetzung erhalten, welche Vorgänge und Reaktionen erleichtert oder erst ermöglicht. Über die semipermeable Plasmamembran können selektiv Stoff- oder Ladungsgradienten ausgebildet und aufrechterhalten werden, die z. B. beim membranüberspannenden Transport oder der Signalweiterleitung notwendig sind (Berg *et al.* 2013).

Schon 1895 wurde erkannt, dass zelluläre Membranen aus Lipiden aufgebaut sind (Overton 1895). Einige Jahre später fanden Gorter und

Grendel heraus, dass Lipide sich zu einer Doppellipidschicht zusammenlagern (Gorter & Grendel 1925). Dabei sind die Azyketten der Lipide und lipophile Teile von Proteinen sind zum Inneren der Membran hin orientiert, während die hydrophilen Bereiche wie die Kopfgruppen der Lipide oder polare Proteinketten zum wässrigen Medium hin ausgerichtet sind (Danielli & Davson 1935; Lenard & Singer 1966). Bei der Herstellung fusionierter Zellen wurde schließlich im Jahr 1970 klar, dass die Plasmamembran nicht einen starren, sondern einen fluiden Charakter hat und Lipide wie auch Proteine darin lateral diffundieren können (Frye & Edidin 1970).

2.1.1 Lipide der Plasmamembran

Säugetierzellen enthalten tausende verschiedene Lipide. Ihnen ist ihr amphiphiler Charakter mit hydrophoben Azyketten und hydrophilen Kopfgruppen gemein. Die Hauptklassen der membranbildenden Lipide sind die Glycerophospholipide, die Sphingolipide und die Sterole. Die Lipide assemblieren eigenständig durch hydrophobe Interaktionen, van-der-Waals-Kräfte und weitere schwache Wechselwirkungen zu den Lipiddoppelschichten.

In eukaryotischen Zellen sind vor allem die Glycerophospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylsäure (PA) am Aufbau der Plasmamembran beteiligt. Diese setzen sich aus einem langen hydrophoben Teil aus Diacylglycerin (DAG) und einer hydrophiler Kopfgruppe, bestehend aus einem Phosphatrest (bei PA) oder phosphat-veresterten Alkoholen, zusammen. Das prädominante Phospholipid in zellulären Membranen ist Phosphatidylcholin.

Die zweite Klasse der Membranlipide (Sphingolipide) leitet sich von einem Sphingosinrückgrat, mit daran gebundener Fettsäure, ab. Zu den Sphingolipiden zählen einige Glykolipide, deren Rückgrat mit

Kohlenhydrateinheiten verknüpft ist. Je nachdem in welcher Ausrichtung der Zuckerrest an das Lipidrückgrat gebunden ist, werden diese Bindungen als α -oder β -Verknüpfung bezeichnet. Verzweigte Kohlenhydratketten treten bei Gangliosiden wie z. B. dem Monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) auf.

Die letzte Klasse wird durch die Sterole mit Cholesterol als dominantestem Vertreter gebildet (Berg *et al.* 2013). Cholesterol wirkt dabei in ungesättigten, phospholipid-reichen Membranen verfestigend, während es die Fluidität von Membranen mit doppel-gesättigten Lipiden erhöht. Außerdem kann es in Modellmembranen phasen-separierend wirken was zu der Annahme einer ähnlichen Rolle in nativen Membranen führte (Maxfield & van Meer 2010).

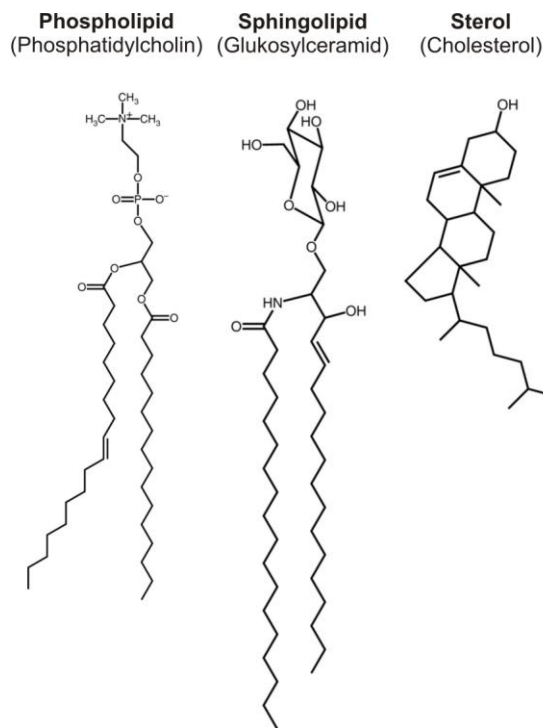


Abbildung 1 Membranlipidklassen

Strukturformeln von typischen Vertretern der Membranlipidklassen eukaryotischer Zellen.

Phospholipide wie Phosphatidylcholin bestehen aus einem Glycerolrückgrat. Zwei Fettsäureketten sind damit verestert und eine charakteristische Kopfgruppe ist über eine Phosphodiesterbrücke gebunden. Das Sphingolipid Glukosylceramid leitet sich von Sphingosin ab, mit dem eine Fettsäurekette über eine Amidbindung und eine charakteristische Kohlenhydratgruppe (Glukose) verknüpft sind. Das membranständige Sterol Cholesterol besteht aus Kohlenwasserstoffringen die mit einer lipophilen Schwanzgruppe und einer polaren Hydroxylgruppe verbunden sind.

Abbildung entnommen und verändert aus Mansy 2010.

Entgegen der früheren Lehrmeinung dienen Lipide nicht ausschließlich als strukturelles Grundgerüst bzw. als Lösungsmittel für Proteine, sondern nehmen in zellulären Membranen unterschiedlichste Aufgaben wahr. So wurde z. B. in dynamischen Simulationen gezeigt, dass allein die Form der individuellen Lipide den Krümmungsgrad der Membranen beeinflussen kann

(Cooke & Deserno 2006). Dies wurde von Roux *et al.* 2005 mit künstlichen Membranen bestätigt, bei denen sich Zusammenhänge zwischen Membrankrümmung/-abschnürung und der Lipidkomposition zeigen ließen (Roux *et al.* 2005). In solchen artifiziellen Membranen führen die physikochemischen Eigenschaften der Lipide zur Ausbildung von unterschiedlichen Phasen (Scherfeld *et al.* 2003; Goh *et al.* 2013), die möglicherweise in nativen Membranen verschiedene Reaktionsbereiche für Proteine ausbilden, wie vom *Membrane-Raft-Modell* (siehe S. 12) vorgeschlagen.

Eukaryotische Plasmamembranen weisen eine Lipidasymmetrie zwischen intra- und extrazellulärer Lipidschicht auf (van Meer 2011). Diese Asymmetrie ist z. B. bei der Signaltransduktion wichtig, ihr Abbau ist ein Indikator apoptotischer Zellen (Schlegel & Williamson 2001).

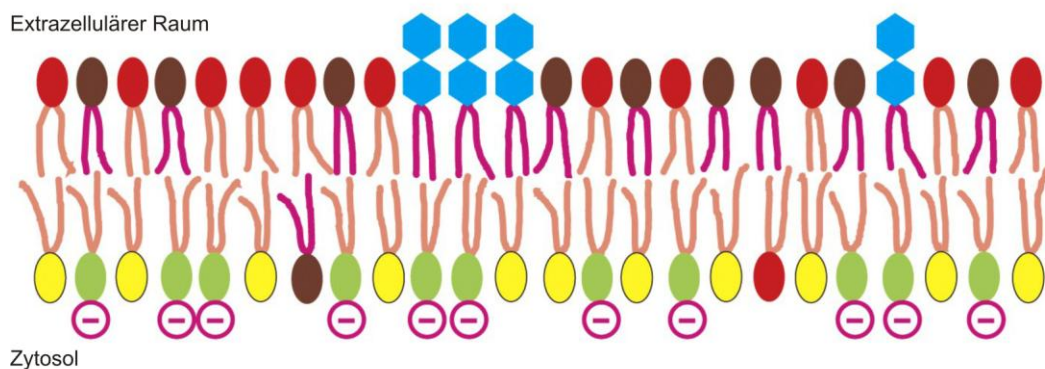


Abbildung 2 Lipidasymmetrie der Plasmamembran von Erythrozyten

Schema einer asymmetrischen Lipiddoppelschicht. Gelb, Phosphatidylethanolamin (PE); Grün, Phosphatidylserin (PS); Rot, Phosphatidylcholin (PC); Braun, Sphingomyelin (SM); Blau, Glykolipide. Die Darstellung überzeichnet die Asymmetrie modellhaft. Abbildung entnommen und verändert aus Alberts 2008 (Fig. 10.16).

An der Weiterleitung extrazellulärer Signale in das Zellinnere sind auch einige Lipide der inneren Membranschicht beteiligt. Diese sind an vielfältigen zellulären Prozessen wie z. B. der Phagozytose, der Pinozytose, der

regulierten Exozytose oder dem Rearrangieren des Zytoskeletts beteiligt (Czech 2000). Nach hydrolytischer Spaltung der Lipide durch Lipasen können die einzelnen Lipidbestandteile als primäre und sekundäre Botenstoffe dienen, die mit einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege assoziiert sind (Oude Weernink *et al.* 2007).

2.1.2 Proteine der Plasmamembran

Ein hoher Anteil zellulärer Proteine befindet sich in Kontakt mit der Membran oder ist integraler Bestandteil dieser. Dabei variiert das Lipid-Protein-Verhältnis je nach Membrantyp und -funktion. Die Proteine sind für eine Vielzahl der Membranfunktionen verantwortlich und dienen z. B. als Rezeptoren, Ankerpunkte, Transporter oder Enzyme.

Generell kann man zwischen peripheren und integralen Membranproteinen unterscheiden. Periphere Membranproteine sind meist nur mit der Membran assoziiert, indem sie Wechselwirkungen mit anderen membrangebundenen Proteinen eingehen. Die integralen Membranproteine hingegen durchspannen entweder die Membran oder sind durch hydrophobe Ankermoleküle fest an die Membran gebunden. Transmembranproteine können einen oder mehrere Membrandurchgänge aufweisen; sie besitzen häufig α -helikale Strukturen oder bilden β -Fässer durch die Kombination von Faltblattstrukturen. Verankerte integrale Proteine inserieren in den hydrophilen Bereich der Membran über Myristyl-, Palmitoyl- oder Farnesylketten (Alberts 2008).

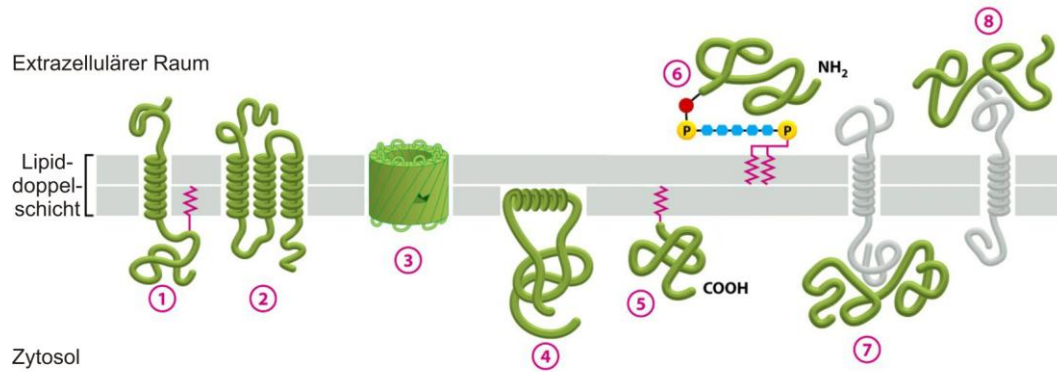


Abbildung 3 Verschiedene Arten von peripheren und integralen Membranproteinen

Integrale Membranproteine durchspannen die Membran: (1): einfach mit einer α -Helix, (2) mehrfach mit multiplen α -Helices, (3) als Fass aus β -Faltblättern. Andere Membranproteine integrieren in eine der Lipidschichten mittels: (4) amphipatischer α -Helices, (5) durch Fettsäure- oder Prenylketten oder (6) über eine Kohlenhydratkette als Verbindungsstück zu einem Phosphatidylinositol (PI).

Periphere Membranproteine (7 und 8) sind mit der Membran über integrale Proteine assoziiert.

Abbildung entnommen und verändert aus Alberts 2008 (Fig. 10.19).

Die Einbettung in die Lipide und Proteine der Membran ist entscheidend für die Funktion der Membranproteine (Dowhan & Bogdanov 2011; Contreras *et al.* 2012). So wurde z. B. für den wichtigen Glukosetransporter die Lipidabhängigkeit seiner Aktivität gezeigt (Carruthers & Melchior 1988). Und auch Protein-Protein-Interaktionen bzw. das Clustern von Membranproteinen sind sowohl bei physiologischen Prozessen (Lang 2007; Halemani *et al.* 2010) als auch bei krankheits-assoziierten zellulären Prozessen (Schreiber *et al.* 2012) von Bedeutung. Daher ist es nicht erstaunlich, dass veränderte Membraneigenschaften mit schweren pathologischen Veränderungen wie z. B. der Insulinresistenz (Kabayama *et al.* 2007) in Verbindung gebracht werden.

2.1.3 Modelle zur Organisation von Membranen

Wie schon beschrieben variieren Lipid- und Proteinzusammensetzungen in zellulären Membranen verschiedener Zelltypen und zu verschiedenen Zeitpunkten (Winterbourn & Batt 1970). Sogar innerhalb der Plasmamembran einer Zelle kann sich die Lipid- und Proteinzusammensetzung deutlich unterscheiden, wie am Beispiel der apikalen und basolateralen Membranen epithelialer Zellen zu erkennen ist (Simons & Fuller 1985). Auch innerhalb der Zelle weisen membranumgebene Organellen deutliche Unterschiede der Protein- und Lipidkomposition auf (Holthuis *et al.* 2003; van Meer *et al.* 2008; Andreyev *et al.* 2010).

Die offensichtliche Verbindung zwischen Membranzusammensetzung und Form und Funktion von Zellen und ihren Kompartimenten führte im Laufe der Jahre zu vielen Erklärungsansätzen und Modellen der Membranorganisation, ohne dass die Zusammenhänge bisher vollständig aufgeklärt wären:

Fluid-Mosaic-Modell

Ein fundamentales Modell zur Erklärung der Zellmembranen wurde 1972 vorgestellt. Zuvor war festgestellt worden, aus welchen Komponenten sich die biologischen Membranen zusammensetzen, und es wurde die Meinung vertreten, dass Proteine nur an die Lipidmembran angelagert vorliegen (Danielli & Davson 1935).

In dem auf thermodynamischen Überlegungen basierenden *Fluid-Mosaic-Modell* beschrieben Singer und Nicolson die Assemblierung der Membran als Lipiddoppelschicht in der integrale Membranproteine aufgrund ihrer amphipatischen Eigenschaften gelöst sind. In diesem Meer von Lipiden sollten die Proteine lateral beweglichen sein und Unterschiede der Membrandicke wurden durch die asymmetrische Verteilung von eingetauchten oder durchspannenden Proteinen erklärt (Singer & Nicolson 1972).

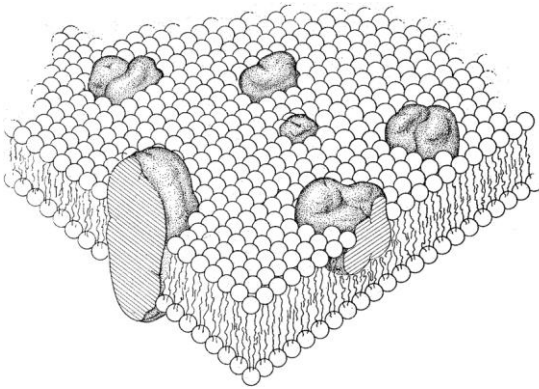


Abbildung 4 Das Fluid-Mosaic-Modell

Das Modell stellt die Plasmamembran als eine Lipiddoppelschicht dar. Lipophile Bereiche der Lipide sind zum Inneren der Doppelschicht hin ausgerichtet, hydrophile hingegen hin zur wässrigen Umgebung. Integrierte Membranproteine „schwimmen“ lateral beweglich in dem Lipidmeer. Abbildung entnommen aus Singer und Nicolson 1972.

Weitere Forschungen ergaben jedoch, dass es sich bei den zellulären Membranen nicht um ein Meer aus Lipiden mit isoliert darin schwimmenden Proteinen handelt, sondern vielmehr um ein dicht gedrängtes Proteingemenge (Takamori *et al.* 2006) mit zahlreichen Proteininteraktionen. Trotz seiner überholten Annahmen diente das Singer-Nicolson-Modell mit seinem generellen Ansatz jedoch als Ausgangspunkt für viele weitere Untersuchungen und Erklärungsansätze im Feld der Membranbiologie.

Picket-Fence-Modell

Auf Grund von Beobachtungen, nach denen Membranproteine in Plasmamembranen nicht ungehindert diffundieren können (Sheetz *et al.* 1980), wurde klar, dass das *Fluid-Mosaic*-Modell nicht ausreichend den Zustand zellulärer Membranen beschrieb. Es zeigte sich nämlich, dass Proteine wie auch Lipide (Fujiwara *et al.* 2002) in Arealen von $0,2-0,3 \mu\text{m}^2$ in ihrer Diffusion beschränkt vorliegen (Sako & Kusumi 1995). Das daraus entwickelte Modell beruht auf dem Prinzip der passiven Einschränkung der Lipid- und Proteindiffusion durch das Zytoskelett. Die Vorstellung, dass das Zytoskelett wie ein Zaun (*fence*) die Diffusionsräume begrenzt und über Transmembranproteine als Pfähle (*pickets*) in der Membran verankert ist (Kusumi *et al.* 2005), war für die Namensgebung verantwortlich.

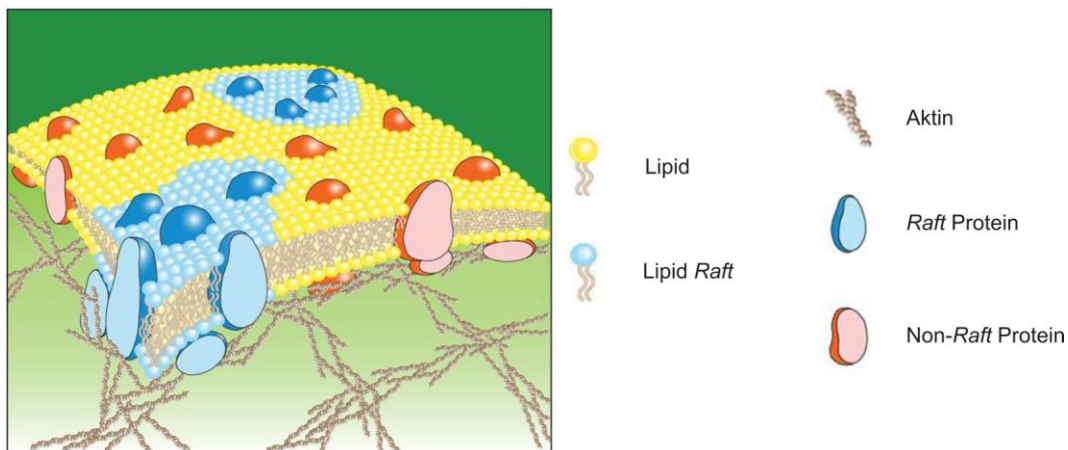


Abbildung 5 Das Picket-Fence-Modell

Membranproteine werden nach dem Modell durch das subplasmalemmale Zytoskelett in Diffusionsräumen eingesperrt. Zur Verankerung des Zytoskeletts dienen Transmembranproteine. Die Eingrenzung in Mikrokompimente ist also passiver Natur. Die Darstellung wurde Klammt *et al.* 2012 entnommen und verändert.

Membrane-Raft-Modell

Wie oben erwähnt wurde, liegen in apikalen und basolateralen Membranen epithelialer Zellen unterschiedliche Membranzusammensetzungen vor. Diese Beobachtung führte zu der Frage, wie sich die unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen ausbilden können.

In dem Modell der *Lipid Rafts* wurde vorgeschlagen, dass bereits in der luminalen Lipidschicht des Golgi Apparats durch Separierung der Lipide Mikrodomänen entstehen, die selektiv über vesikulären Transport entweder in die apikale oder die basolaterale Membran gelangen (van Meer & Simons 1988).

Der Kernmechanismus hinter der Ausbildung dieser Lipidmikrodomänen/Lipidflöße (engl. *Lipid Rafts*) sollte die Phasenseparierung bedingt durch physikochemische Eigenschaften der Lipide sein. Durch solche Mechanismen gebildete *liquid-ordered phases* und *liquid-disordered phases* waren schon in artifiziellen Membranen beobachtet worden (Ipsen *et al.* 1987).

Dieses Konzept zur Membranmikrokompartimentierung, wurde auf die Plasmamembran erweitert (Simons & Ikonen 1997) und die *Lipid Rafts* durch detergentenbasierte Methoden der Membranfraktionierung nach Solubilisierung definiert (Mairhofer *et al.* 2002; Brown 2002). Detergenten-resistente Membranen (DRMs), die bei der Membranfraktionierung auftraten, sollten dabei die *Lipid Rafts* der Plasmamembran widerspiegeln. In diesen *Lipid Rafts* sollen sich die Proteine passiv auf Grund der Eigenschaften ihrer Transmembranbereiche anreichern.

Da die biochemische Methode zur DRM-Aufreinigung stark artefaktbehaftet ist (Munro 2003) und es umstritten ist, ob sich in komplexen Membranen überhaupt Lipidphasen ausbilden können (so wie in einfachen artifiziellen Systemen) wurde die Definition abgewandelt. Die nun als *Membrane Rafts*

bezeichneten Mikrodomänen vermeiden die Definition per DRMs oder *liquid-ordered phases* und werden aktuell beschrieben als: „...kleine (10-200 nm), heterogene, hoch dynamische, sterol- und sphingolipid-angereicherte Domänen, die zelluläre Prozesse kompartmentalisieren. Kleine *Rafts* können manchmal durch Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen stabilisiert werden und größere Plattformen bilden“ (aus dem Englischen übersetzt)(Pike 2006).

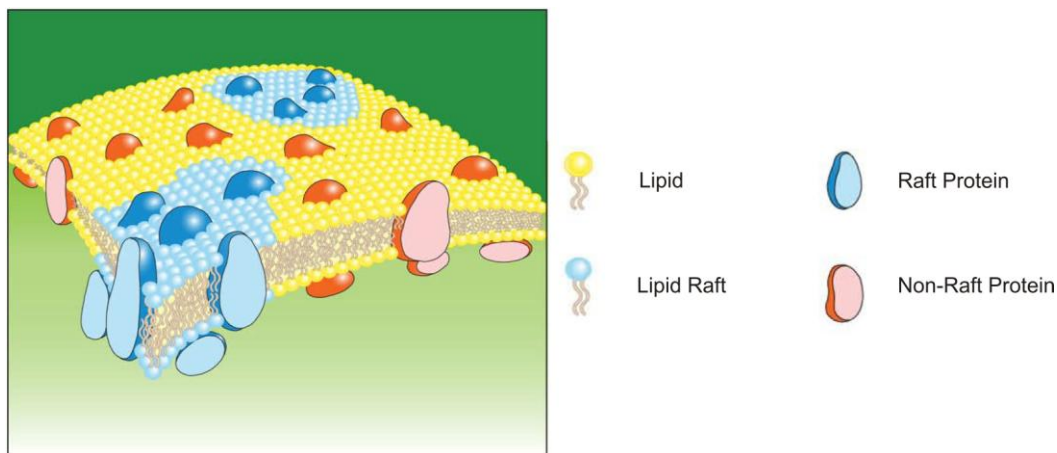


Abbildung 6 Das Membrane-Raft-Modell

Phasenseparation durch Lipid-Lipid-Wechselwirkung bedingt eine Kompartimentalisierung der Membran in *Raft*- (blau) und *Non-Raft*-Bereiche (gelb). In den *Membrane Rafts* reichern sich spezielle Proteine (blaue, große membranintegrierte Objekte) an. Die Darstellung wurde Klammt *et al.* 2012 entnommen und verändert.

Die Organisationsprinzipien der Plasmamembran werden auch in Bezug auf die Lipide immer noch kontrovers diskutiert, z. B. auf Grund der Schwierigkeiten, Lipide nativ in ihrem zellulären Kontext zu untersuchen.

Modell der Clusterbildung durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen

Das Modell der Clusterbildung durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen steht nicht im generellen Gegensatz zu dem *Picket-Fence*- und dem *Membrane-Raft*-Modell, sondern erklärt weitergehend

Beobachtungen, die nicht ausschließlich mit den in beiden Modellen vorgeschlagenen Mechanismen beschrieben werden können.

Jedoch unterscheidet es sich im Erklärungsansatz der Membranmikrokompartimentierung. Im Gegensatz zu dem *Picket Fence*- und dem *Membrane-Raft*-Modell erfolgt darin das Proteinclustern nicht über passive Mechanismen der sterischen Eingrenzung (*Picket-Fence*-Modell) oder als Resultat von Phasenseparation (*Membrane-Raft*-Modell), sondern aktiv über spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen.

Sieber *et al.* zeigten, dass Isoformen eines Proteins trotz identischer Transmembrandomänen in unterschiedlichen Membranproteinclustern lokalisiert waren (Sieber *et al.* 2006). Diese Beobachtungen waren nicht mit dem lipidplattform-basierten Membranorganisationsmodell der *Membrane Rafts* erklärbar. Auf Grund der identischen Transmembrandomänen von Syntaxin1 und Syntaxin4 (untersuchte Proteinisoformen) konnte nicht nur die Lipidumgebung der Plasmamembran für das unterschiedliche Clustern verantwortlich sein.

Gegen die ausschließliche Kompartimentierung der Plasmamembran per *Picket-Fences* sprechen überdies die Beobachtungen, dass Proteine mit sehr ähnlichem strukturellem Aufbau nicht gleich lokalisieren (Uhles *et al.* 2003; Sieber *et al.* 2006; Kai *et al.* 2006; Low *et al.* 2006). Bei sterischer Eingrenzung durch zytoskelettale Komponenten dürften Proteine vergleichbarer Größe und Struktur nicht in unterschiedlichen „Käfigen“ gefangen sein. Tatsächlich kann aber schon eine einzelne Proteindomäne für die Segregation in spezielle Proteincluster verantwortlich sein (Sieber *et al.* 2006) und so die Anordnung aller Proteine eines Typs in der Membran bestimmen. Daher können nur hochspezifische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der Grund für die Proteinclusterbildung sein.

Diese Erkenntnis führte zu dem Modell des durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelten Proteinclusterns als dominantem

Organisationsprinzip der Plasmamembran. Ein Beispiel hierfür ist die dichte Packung von Proteinen aufgrund von Homooligomerisierung, bei der das Gleichgewicht zwischen Proteinanziehung und -abstoßung die Größe der Packungseinheiten (Cluster) definiert (Sieber *et al.* 2007)(siehe Abbildung 7).

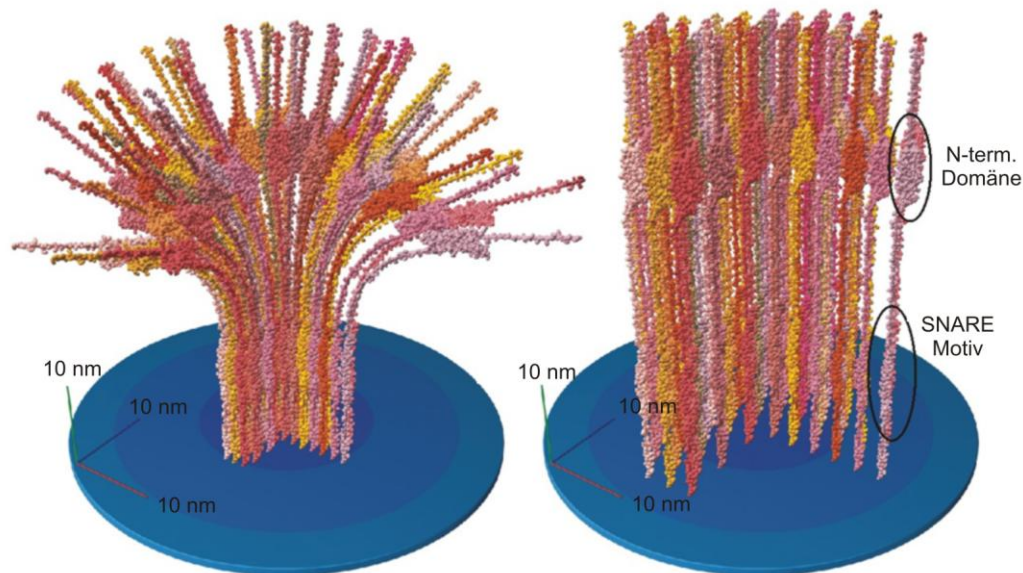


Abbildung 7 Modell eines dicht gepackten Proteinclusters

Nach der Clusterbildung von Proteinen durch spezifische Wechselwirkung zwischen ihnen, können diese unterschiedliche Konformationen und Packungsgrade im Cluster annehmen. Sowohl die Tertiärstruktur der Proteine, als auch ihre Ladung können die Packungsdichte der Proteine und die Clustergröße bestimmen.

Es sind zwei Beispiele für das mögliche Aussehen von Syntaxin-Clustern gezeigt. Die Abbildung stammt aus Sieber *et al.* 2007 und wurde verändert.

Der Einfluss von *Membrane Rafts* oder *Picket Fences* als überlagerte Mechanismen wird in diesem Modell nicht ausgeschlossen, jedoch die Protein-Protein-Interaktionen als der Mechanismus erachtet, der die beobachtete Spezifität bei der Clusterbildung vermittelt.

Modell des elektrostatischen Proteincusterwachstums

Ergänzend zu den spezifischen Protein-Protein-Interaktionen des vorherigen Modells zeigte sich, dass auch weniger spezifische elektrostatische Wechselwirkungen von Proteinen mit Ionen wie z. B. Ca^{2+} die Dynamik von Proteincustern in der Plasmamembran beeinflussen (Zilly *et al.* 2011). Es wurde beobachtet, dass der *second messenger* Ca^{2+} schon bei geringen Konzentrationen die Clustergröße von Proteinen mit negativer Ladung erhöht. Erklärt wird diese Tatsache im Modell des elektrostatischen Proteincusterwachstums durch eine kompensatorische Wirkung der positiven Ladung des Ca^{2+} .

Danach erhöhen sich im Laufe der Bildung von Ca^{2+} -freien Proteincustern mit zunehmender Größe auch die Abstoßungskräfte zwischen negativ geladenen Aminosäureresten benachbarter Proteine des Clusters. Dadurch kommt es ab einer bestimmten Größe der Cluster zu einem Gleichgewicht zwischen Abstoßung (durch negative Ladungen) und Anziehung (durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen) und das Wachstum stoppt. Die Vergrößerung der Proteincuster bei erhöhter Ca^{2+} -Konzentration erklärt das Modell durch die kompensatorische Wirkung der positiven Ca^{2+} -Ionen, die sich zwischen die negativ geladenen Aminosäuren einlagern. Die Grenze des Proteincusterwachstums wird somit umgangen und die Proteine aggregieren zu größeren Clustern.

Ein solcher Ca^{2+} -vermittelter Mechanismus ist interessant, da dadurch die Regulation biologischer Prozesse durch den *second messenger* anhand der Proteincustergröße vorstellbar ist. Als ein denkbare Beispiel könnte die Aktivierbarkeit von SNAREs durch verstärktes Clustern herabgesetzt werden und so ein refraktärer Zustand der Zelle verstärkt werden (Zilly *et al.* 2011).

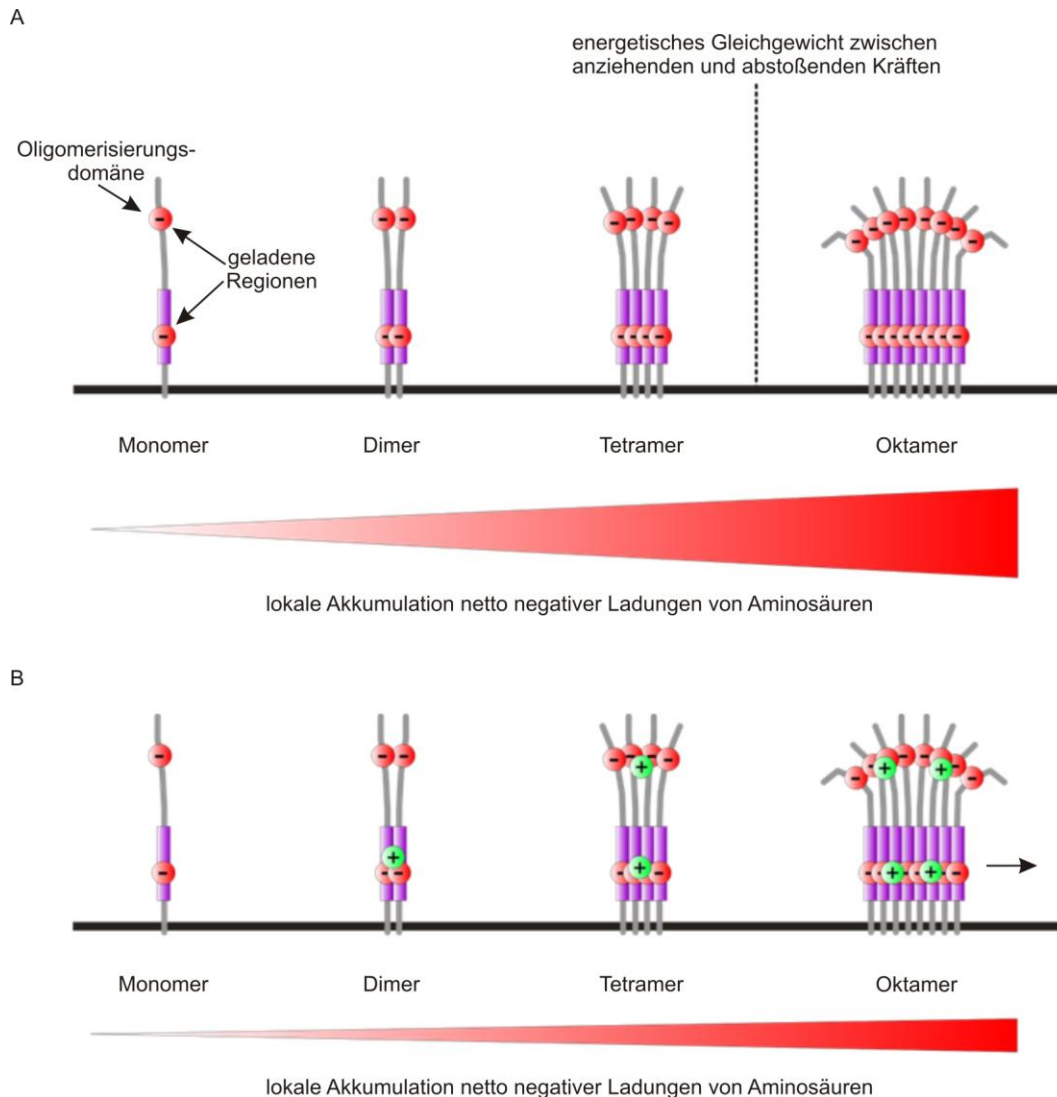


Abbildung 8 Modell elektrostatisch-vermittelten Clusterwachstums

(A) Negativ akkumulierte Ladungen in Proteinclustern erzeugen eine Gegenkraft, die der Anlagerung weiterer Proteine bzw. dem Größenwachstum von Clustern entgegenwirkt. (B) Positiv geladene Ionen, wie z. B. Ca^{2+} kompensieren das negative Ladungspotential. Durch diese elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Ionen und den Proteinen kann eine größere Anzahl an Proteinen in Clustern angeordnet werden. Abbildung entnommen und verändert aus der Dissertation von Walrafen 2012.

Protein-Island-Modell

Aus elektronenmikroskopischer Untersuchung der Membran-präparationen von aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen entwickelten Lillemeier *et al.* das Modell der *Protein Islands* (Lillemeier *et al.* 2006). Die cholesterol-

reichen *Protein Islands* wurden durch hochauflösende Lichtmikroskopie auch am TCR verifiziert (Lillemeier *et al.* 2010). Nach dem *Protein-Island-Modell* befinden sich das Gros bzw. alle Membranproteine in großen cholesterolreichen „proteinophilen“ Membrankompartimenten. Die aktin-abhängige Formierung und Erhaltung der *Protein Islands* geschieht durch Protein-Protein-Interaktionen und/oder durch deren Affinität für bestimmte Lipide (Lillemeier *et al.* 2006). Die *Protein Islands* sind umschlossen von einer proteinfreien Lipidmembran und beinhalten sowohl *Membrane-Raft*-Bereiche als auch *Non-Raft*-Bereiche in denen die Proteine jeweils geclustert vorliegen.

Somit vereint das *Protein-Island-Modell* sowohl Teile des Modells der spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen (in den proteinophilen Membrankompartimenten), des *Membrane-Raft-Modells* (Phasenseparation von Lipiden in den *Protein Islands*) wie auch des *Picket-Fence-Modells* (freie Diffusion innerhalb der *Protein Islands*, jedoch aktin-abhängige beschränkte Diffusion auf Ebene der Gesamtmembran).

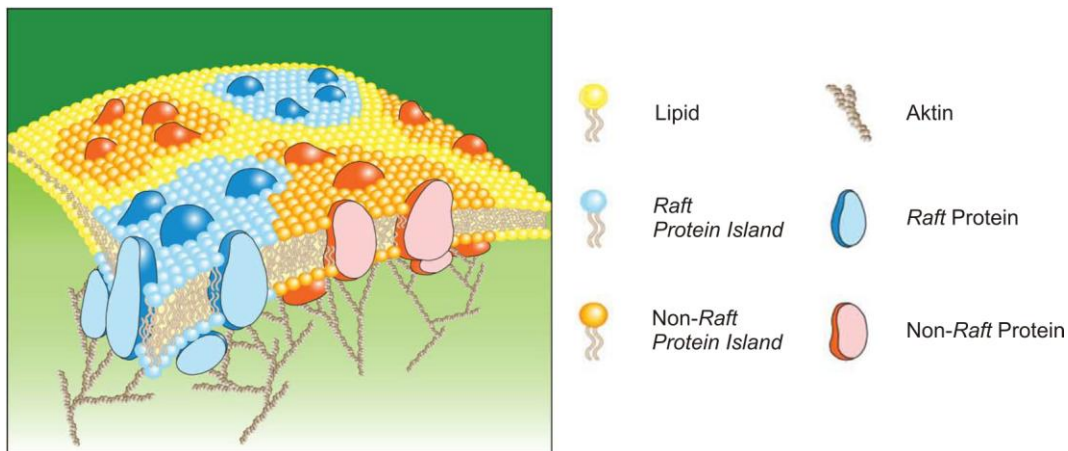


Abbildung 9 Das Protein-Island-Modell

In der Membran gibt es „proteinophile“ Membrankompartimente, die sich aus *Raft*- (blau) und *Non-Raft*-Bereichen (orange) zusammensetzen und so von der restlichen Membran (gelb) abgegrenzt sind. Die *Protein Islands* reichern eine Vielzahl verschiedener Proteine an (blaue und rote größere Objekte). Die Darstellung wurde Klammt *et al.* 2012 entnommen und verändert.

Trotz der Vielzahl an Modellen ist die genaue Organisation zellulärer Membranen noch nicht hinreichend genau erklärt. So ist z. B. unklar, ob es eine Hierarchie bzw. Wichtigkeit der Clusterphänomene gibt und wie sich diese auf die Funktion der Proteine auswirkt. Wahrscheinlich bildet ein komplexes Wechselspiel unterschiedlichster physikalischer, chemischer und biologischer Einflussfaktoren die Basis für die Membranorganisation und -funktion. Insofern sind zusätzliche Untersuchungen zur Adressierung der Interaktionen von Membranproteinen und -lipiden nötig, um weitreichendere Einsichten zu erlangen.

Ein lohnenswertes Untersuchungsobjekt als Beispiel für Membranorganisationen ist der oben angesprochene TCR wegen seines komplexen Clusterverhaltens (in Kapitel 2.2.4 besprochen) und seiner Protein-Lipid-Interaktionen (Thomas *et al.* 2003; Zhu *et al.* 2011).

2.2 Der T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR): Rezeptor mit verschiedenen Organisationsgraden

Der T-Zell-Rezeptor weist in der Plasmamembran eine Vielzahl aktivierungsabhängiger Mikrokompartimentierungen auf und bildet als solche Nano-, Mikro- und supramolekulare Cluster aus. Die Membranorganisation bedingt seine Funktionen und macht ihn daher zu einem interessanten Protein zur Erforschung der Einflüsse auf die allgemeine Membranorganisation.

2.2.1 T-Zellen und der TCR im Kontext des Immunsystems

Das Immunsystem ist das Bollwerk des Körpers gegen Eindringlinge. Durch zwei Bestandteile, das innate oder angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem, hat sich der Körper gut gegen das Eindringen von Fremdkörpern und –organismen gewappnet. Beide Teile des Immunsystems bestehen überwiegend aus wandernden, hochspezialisierten Zellen. Beim Eindringen von Bakterien oder anderen Fremdstoffen in den Körper bildet das innate Immunsystem unter anderem mit seinen Makrophagen die erste breite Abwehrbarriere. Das adaptive Immunsystem, zu dem auch die T-Zellen gehören, ist mit seinen hochspezialisierten Antigenrezeptoren Teil einer zweiten, spezifischeren Antwort gegen nahezu alle Pathogene. Die Adaption des Immunsystems ermöglicht es dem Körper, spezialisierte Zellen gegen bereits bekämpfte Pathogene auf Vorrat zu halten und so erneuten Infektionen vorzubeugen bzw. schnell auf diese zu reagieren.

Schlüssel des adaptiven Immunsystems zu diesen hochspezifischen Antworten auf Antigene (und somit auch Pathogene) nahezu unendlicher Vielfalt sind die antigenspezifischen Lymphozyten. Die sogenannten B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) tragen auf ihrer Oberfläche spezialisierte Rezeptoren mit starker Variabilität, den B-Zell-Rezeptor (BCR) bzw. den T-Zell-Rezeptor (TCR). Sowohl BCR als auch TCR bestehen aus variablen Bereichen (V), die während der Zellreifung eine

zufällige Rekombination erfahren und in einer jeweils einzigartigen Struktur resultieren, sowie aus konstanten Regionen (C). Während der Reifung durchlaufen die Lymphozyten diverse Selektionsprozesse, nach denen alle gereiften Zellen ausschließlich Rezeptoren mit identischer Struktur der V- und C-Regionen exprimieren. Die Selektionsprozesse der klonalen Expansion und der klonalen Deletion, erhöhen die Anzahl der pathogenspezifischen Lymphozyten und entfernen autoreponsive B- und T-Zellen. Die klonale Selektion stellt somit die eigentliche Ursache für die Antigenspezifität eines reifen Lymphozyten für sein Antigen dar (Janeway 2008).

Die antigen-erkennenden Proteine der B-Zellen, die Immunoglobuline, können sowohl membrangebunden als BCR vorliegen oder mit gleicher Antigenspezifität auch als Antikörper von den B-Zellen sezerniert werden. Der TCR hingegen liegt immer in einer membranständigen Form vor.

2.2.2 Aufbau des TCR

Der T-Zell-Rezeptor wurde 1986 durch die Verwendung von monoklonalen Antikörper entdeckt und isoliert. Er ist ein Protein-Komplex und besteht unter anderem aus den Teilen α und β (Marrack & Kappler 1986). Zusätzlich zu der α - und β -Kette enthält der physiologisch aktive TCR-Komplex (im Folgenden nur noch als T-Zell-Rezeptor oder TCR bezeichnet) noch den Multi-Protein-Komplex CD3. Die einzelnen Bestandteile von CD3 sind die γ -, δ -, ϵ - und ζ -Proteine (Kanellopoulos *et al.* 1983; Borst *et al.* 1983; Samelson *et al.* 1985).

Alle Bestandteile des TCR sind Typ I Transmembranproteine, das heißt sie durchspannen die Plasmamembran einfach und ihr N-Terminus ist extrazellulär lokalisiert.

Die α - und β -TCR-Ketten bilden zusammen ein Heterodimer, das über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Sie verfügen über eine variable Region, welche

die Spezifität für das Antigen vermittelt und an der Peptid-MHC-Bindung beteiligt ist. Die konstante Region dient mit daran anschließender Transmembran- und kurzer Intrazellulärdomäne als struktureller Ankerpunkt in der Membran.

Die CD3-Proteine bewirken die Signaltransduktion der durch $\text{TCR}\alpha\beta$ -vermittelten Peptid-MHC-Bindung. Im extrazellulären Teil bestehen $\text{CD3}\epsilon\gamma$ und $\text{CD3}\epsilon\delta$ je aus zwei immunoglobulin-ähnlichen Domänen. Das Dimer $\text{CD3}\zeta\zeta$ hat hingegen nur einen sehr kleinen extrazellulären Teil, bestehend aus 9 Aminosäuren. An der Signaltransduktion des TCR sind vor allem die zehn intrazellulären ITAM-Motive (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) der CD3-Proteine beteiligt (Irving & Weiss 1991; Romeo *et al.* 1992; Love & Hayes 2010). Diese wurden 1989 identifiziert. Sie bestehen aus einem doppelten Sequenzmotiv und enthalten jeweils 2 Tyrosinreste (Reth 1989), die bei T-Zell-Aktivierung phosphoryliert werden. Sechs von zehn ITAM-Motiven eines einzelnen TCR werden vom $\text{CD3}\zeta$ -Dimer gestellt, das somit als Schlüsselkomponente der T-Zell-vermittelten Signaltransduktion gilt.

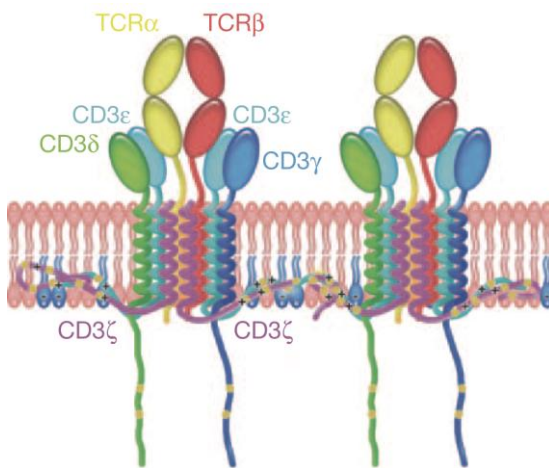


Abbildung 10 Aufbau des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR)

Der TCR setzt sich aus den Dimeren $\text{TCR}\alpha\beta$, $\text{CD3}\epsilon\gamma$, $\text{CD3}\epsilon\delta$ und $\text{CD3}\zeta\zeta$ zusammen. Die extrazellulären Domänen der Immunoglobulin-superfamilie (IgSF) sind als ovale Objekte dargestellt. Intrazellulär binden die die ITAM-Motive enthaltenden Aminosäureketten von $\text{CD3}\zeta$ und $\text{CD3}\epsilon$ über basische Sequenzen (*Basic Rich Sequences* = BRS) an die Lipidschicht. Die intrazellulären Teile von $\text{CD3}\gamma$ und $\text{CD3}\delta$ und ihre ITAM-Motive liegen frei im Zytosol vor. Die Abbildung wurde aus Shi *et al.* 2013 entnommen und Änderungen vorgenommen.

Obwohl sich Forscher seit fast 30 Jahren mit dem Rezeptorkomplex auseinandersetzen, wird die genaue Stöchiometrie der einzelnen Komplexe

noch immer kontrovers diskutiert. Es ist allgemein anerkannt, dass sich der TCR aus den Dimeren TCR $\alpha\beta$, CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$ und CD3 $\zeta\zeta$ konstitutiv zusammensetzt (Kuhns & Davis 2007; Schamel & Alarcón 2013). Dabei erfolgt die Bindung zwischen den Dimeren über geladene Aminosäurereste innerhalb der Plasmamembran (Manolios *et al.* 1990; Blumberg *et al.* 1990; Cosson *et al.* 1991; Rutledge *et al.* 1992; Call *et al.* 2002). Wird der TCR oder die ihn ausbildenden Dimere im ER oder Golgi Apparat nicht richtig assembliert, erfolgt eine Retention und Degradierung des Komplexes (Call *et al.* 2002). Ein Beispiel hierfür ist die verminderte bzw. unterdrückte Oberflächenexpression des TCR bei fehlerhafter Dimerisierung von CD3 ζ (Rutledge *et al.* 1992; Bolliger & Johansson 1999).

Widersprüchlich sind die bisherigen Ergebnisse jedoch hinsichtlich der stöchiometrischen Anordnung der Dimere innerhalb des TCR und der damit verbundenen Valenz, der Anzahl möglicher Antigenbindungen durch einen TCR. Biophysikalische Ansätze deuteten 2011 auf einen monovalenten TCR hin (James *et al.* 2011), wohingegen im gleichen Jahr in einer immunpräzipitationsbasierten Untersuchung eine funktionelle Bivalenz nachgewiesen wurde (Schrum *et al.* 2011). Generell deuten inzwischen mehr Daten auf eine Multivalenz hin, und nach Schamel und Alarcón ist eine Lokalisierung in Nanoclustern wahrscheinlich (Schamel & Alarcón 2013)(siehe Kapitel 2.2.4).

2.2.3 Intrazelluläre Signalkaskaden nach TCR-Aktivierung

Eine T-Zelle wird durch die Bindung an eine antigen-präsentierenden Zelle (APC) aktiviert, wenn der TCR sowohl an ein MHC-gebundenes Antigen als auch an kostimulatorische Proteine spezifisch bindet. Modelle für die genaue Aktivierung in Hinsicht auf das Verhalten des TCR in der Plasmamembran werden im Kapitel 2.2.5 eingehender erläutert. An dieser Stelle soll kurz beschrieben werden, was nach Antigenbindung intrazellulär geschieht.

Durch die Bindung des Peptid-MHC-Moleküls durch das TCR $\alpha\beta$ -Dimer kommt es intrazellulär zur Phosphorylierung der CD3-ITAM-Motive durch die Src-Kinase Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) (Samelson *et al.* 1986; June *et al.* 1990). Die Phosphorylierung geht dabei mit der Ablösung der intrazellulären Bestandteile von CD3 ϵ und CD3 ζ von der Plasmamembran einher (Aivazian & Stern 2000; Xu *et al.* 2008; Shi *et al.* 2013), die wahrscheinlich die Zugänglichkeit für Kinasen erleichtert (Kuhns & Davis 2008). Im inaktiven Zustand wird die Phosphorylierung der ITAM-Motive durch die Phosphatase CD45 unterdrückt, die bei T-Zell-Aktivierung vom TCR separiert wird (Varma *et al.* 2006).

An die phosphorylierten ITAMs bindet ZAP70 (*Zeta-chain-Associated Protein kinase 70*) über seine SH2-Domänen (*Src-Homology 2*), wo es selbst von Lck durch Phosphorylierung aktiviert wird. Aktives ZAP70 rekrutiert unter anderem die Adapterproteine SLP76 (*SH2 domain containing Leukocyte Protein of 76kDa*) und LAT (*Linker for Activation of T cells*) und phosphoryliert diese (Cantrell 2002). Sie dienen als Plattform für die Rekrutierung einer Vielzahl weiterer Proteine, die zahlreiche Signalkaskaden initiieren. So führt z. B. die Membranrekrutierung von SOS (*Son Of Sevenless*), über die Aktivierung von Ras, zur Initialisierung der MAPK-Kaskade (*Mitogen Activated Protein Kinase*) mit der Folge der Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Kern.

Ein weiterer Signalweg ausgehend von SLP76 führt über den GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) Vav zur Aktivierung eines MAPK-Signalweges ausgehend von Rac/Cdc42 und resultiert ebenfalls in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Whitmarsh & Davis 1996). Über diesen Signalweg wird über die Bindung von WASp (*Wiskott-Aldrich-Syndrome protein*) an die aktivierten Rho-Familie GTPasen Rac/Cdc42 zusätzlich das Aktinzytoskelett moduliert (Badour *et al.* 2004). Schließlich wird auch der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel verändert und es werden Lipide metabolisiert über die Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) (Kane *et al.* 2000). Die PLC γ spaltet PIP₂

(*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) in DAG (*Diacylglycerol*) und IP₃ (*Inositol 1,4,5-trisphosphate*), welches an intrazelluläre Ca²⁺-Speicher bindet und dort Efflux von Ca²⁺ in das Zytosol verursacht. Der Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER führt zur Rekrutierung von STIM-Proteinen (*Stromal Interaction Molecule*) an Plasmamembran-ER-Kontaktpunkte, wodurch sich in der Plasmamembran CRAC-Kanäle (*Calcium Release Activated Calcium*) öffnen. Als Folge strömt extrazelluläres Ca²⁺ in die Zelle ein (Hogan *et al.* 2010).

Allgemein wird durch die T-Zell-Aktivierung eine Vielzahl an Prozessen angestoßen, welche auch die Genexpression der Zelle beeinflussen, zur Ausschüttung bestimmter Substanzen führen und strukturelle Veränderungen sowohl innerhalb der Zelle als auch in der Plasmamembran zur Folge haben.

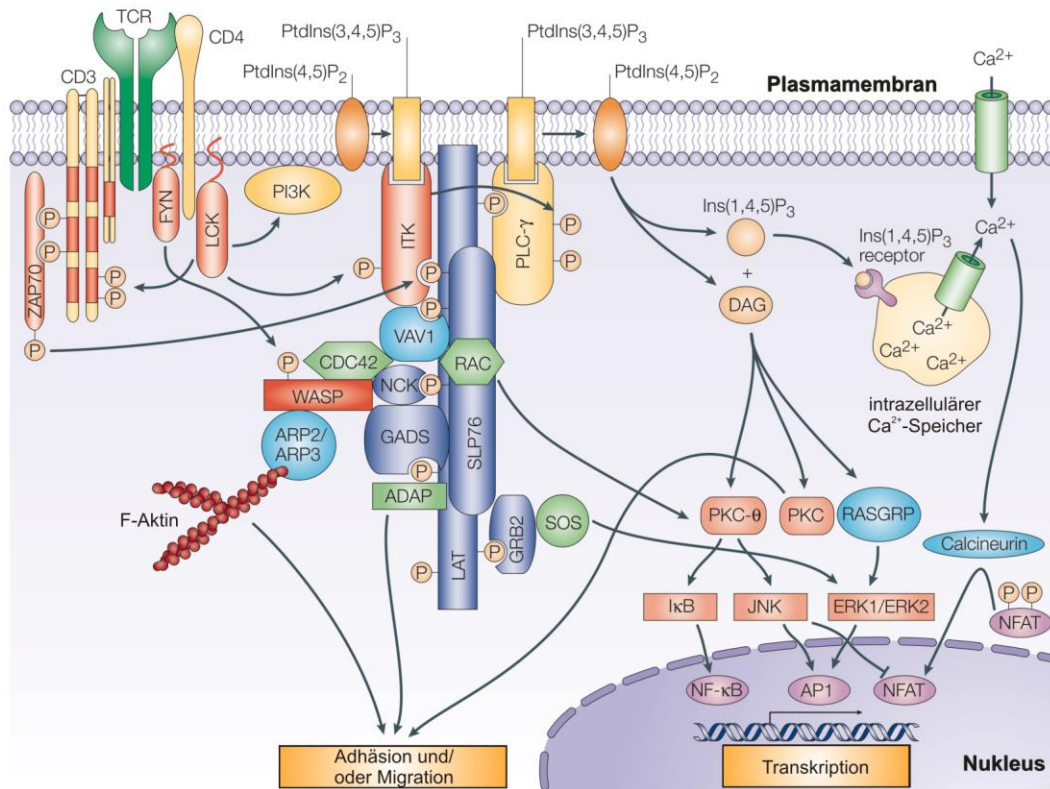


Abbildung 11 TCR-assozierte intrazelluläre Signalwege

TCR-Aktivierung führt zu Kinase-Kaskaden, zur Akkumulation des Aktinzytoskeletts, zur Freisetzung von Ca^{2+} und der Initiation von vielfältigen weiteren intrazellulären Signalwegen. Als Folge der Signaltransduktion kommt es zu veränderter Transkription und zu modifiziertem Verhalten der T-Zellen. Die Darstellung wurde Schwartzberg *et al.* 2005 entnommen und verändert.

2.2.4 Nanocluster, Mikrocluster und die Immunologische Synapse

Jede T-Zelle hat ca. 30.000 T-Zell-Rezeptoren (Fernández-Miguel *et al.* 1999), deren Anordnung in der Plasmamembran, sowie Valenz und Stöchiometrie (siehe Kapitel 2.2.2), nicht genau geklärt sind. Es ist anerkannt, dass der TCR zumindest in aktiviertem Zustand in Form von Mikroclustern vorkommt, die mit konventionellen Lichtmikroskopen (Auflösung ca. 250-300 nm) auflösbare sind (Bunnell *et al.* 2002). Jedoch variiert die experimentell bestimmte Anzahl der TCRs in den als Mikroclustern definierten Strukturen sehr stark (von 11-150 TCR/Mikrocluster)(Yokosuka *et al.* 2005; Varma *et al.* 2006). Das TCR-Supracluster der Immunologischen Synapse, der cSMAC (*central Supramolecular Activation Cluster*), wird als Ansammlung von zentripetal wandernden TCR-Mikroclustern interpretiert (Grakoui *et al.* 1999).

In den letzten Jahren wird auch eine Präassemblierung des TCR vor Aktivierung angenommen und solche TCR-Ansammlungen als Nanocluster beschrieben (Schamel & Alarcón 2013).

Der TCR ist aufgrund seines vielfältigen Clusterverhaltens ein sehr geeignetes Objekt, um an ihm die diversen Modelle zur Proteinorganisation in Membranen zu untersuchen (siehe Kapitel 2.1.3). Im Folgenden werden daher die verschiedenen Clusterzustände genauer besprochen.

TCR-Nanocluster

Im Jahr 2005 wurde die Anordnung des TCR in der Membran mit Hilfe von Elektronenmikroskopie untersucht und festgestellt, dass dieser in Oligomeren von 2-20 Komplexen vorliegt. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen Clustergrad und Cholesterolgehalt der Membran erkannt (Schamel 2005). Diese Cluster wurden auf Grund ihrer Größe von weniger als 200 nm als Nanocluster bezeichnet (Schamel *et al.* 2006). Durch den Einsatz weiterer

elektronenmikroskopischer Methoden (Lillemeier *et al.* 2010) und neuer, hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie (PALM) wurde die Existenz der Nanocluster bestätigt (Lillemeier *et al.* 2010; Sherman *et al.* 2011). Der in Nanoclustern organisierte, nicht-aktivierte TCR wurde in *Protein Islands* (siehe S. 17) lokalisiert (Lillemeier *et al.* 2006; Lillemeier *et al.* 2010) und eine Assoziation mit dem in *Membrane Rafts* vorkommendem GM1 aufgezeigt (Thomas *et al.* 2003).

Die Funktion der Nanocluster wird in der Signalverstärkung und daraus resultierender Sensitivität der T-Zellen vermutet, da antigenerprobte T-Zellen mehr und größere TCR-Nanocluster aufweisen als unerprobte (Kumar *et al.* 2011). Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass T-Zellen, die eine CD3 ζ -Mutante exprimieren, welche kleinere Nanocluster ausbildet, verringerte Sensitivität gegenüber Wildtypzellen haben (Kumar *et al.* 2011). Aus diesen Beobachtungen zu den Nanoclustern stellte Alarcon 2011 die Hypothese auf, dass die TCR-Signalinduktion in den vorgeformten Nanoclustern geschieht und diese an Größe zunehmen, um schließlich gemeinsam mit Adapter- und Signalmolekülen im konfokalen Mikroskop sichtbare Mikrocluster auszubilden (Alarcón *et al.* 2011).

TCR-Mikrocluster

Die Ausbildung von Mikroclustern erfolgt Sekunden nach Bindung des TCR an Peptid-MHC-Moleküle (Bunnell *et al.* 2002). Es bilden verschiedene an der T-Zell-Aktivierung beteiligte Proteine Mikrocluster aus. So weisen der TCR, LFA-1, LAT und weitere Proteine, Mikrocluster auf, die zentripetal wandern und schließlich in einer als Immunologische Synapse bezeichneten Struktur konvergieren (Bunnell *et al.* 2002). Die Ausbildung (Campi *et al.* 2005) und Bewegung von der Peripherie hin zum Zentrum der Kontaktstelle ist abhängig vom retrograden Fluss des F-Aktins. Zusätzlich treiben auch Dynein-Motorproteine den Transport entlang von Mikrotubuli voran (Hashimoto-Tane *et al.* 2011).

Auch die Mikrocluster des TCR wurden in *Protein Islands* (Lillemeier *et al.* 2006) und *Membrane Rafts* (Viola & Gupta 2007) lokalisiert. Neuere Untersuchungen mit hochauflösenden Verfahren verfeinern das bisherige Bild und zeigen unterschiedliche Lokalisierungen von Proteinen, die mit der T-Zell-Aktivierung in Verbindung gebracht werden. Bei Mikroclusterbildung zeigen sich sowohl Vermischung als auch Separation von bestimmten Proteinen innerhalb der Mikrocluster (Sherman *et al.* 2011).

Ein Beispiel ist der Ausschluss von CD45 aus den Mikroclustern (Varma *et al.* 2006), der auf die Mikrocluster als Orte der TCR-Signalinitiation hindeutet (Lee 2002; Yokosuka *et al.* 2005; Campi *et al.* 2005). Dies steht im Gegensatz zu der ursprünglichen Annahme, dass die Initiation von T-Zell-Signalwegen im cSMAC der Immunologischen Synapse stattfinden solle (Monks *et al.* 1998). Wie oben erwähnt deuten neuere Forschungen sogar auf die Aktivierung der Signalwege schon in den Nanoclustern hin.

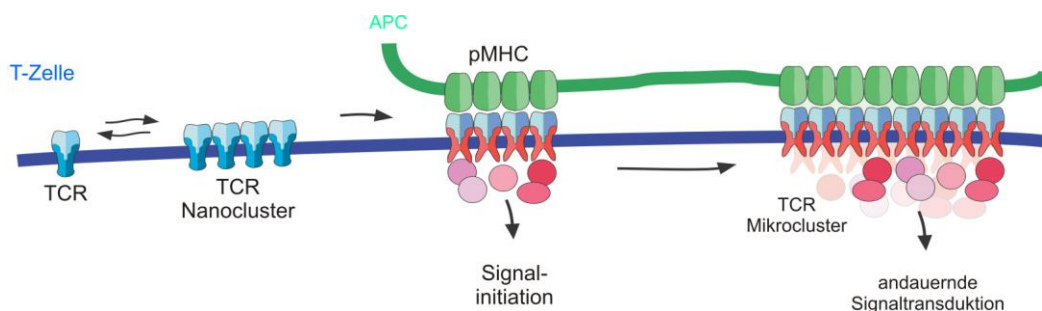


Abbildung 12 Nanocluster- und Mikroclusterbildung

Monomere TCRs präassemblieren zu Nanoclustern und bilden nach Antigen-MHC-Bindung die Mikrocluster aus. Die Darstellung wurde Schamel und Alarcón 2013 entnommen und verändert.

Der genaue Mechanismus der Signalinitiation und –transduktion ist weiterhin ungeklärt, und es gibt verschiedene Modelle, die in Kapitel 2.2.5 weitergehend behandelt werden.

Die Immunologische Synapse

Die Immunologische Synapse (IS) wurde 1984 von Norcross *et al.* beim Vergleich von neuronalen Kontaktstellen mit denen von Lymphozyten zu antigen-präsentierenden Zellen (APCs) vorausgesagt. Auf dem Keystone Symposium 1995 wurde die nachgewiesene Immunologische Synapse mit dem cSMAC von Abraham Kupfer vorgestellt und etwas später publiziert (Monks *et al.* 1998; Grakoui *et al.* 1999; Bromley *et al.* 2001).

Im klassischen Sinne wird die Immunologische Synapse als eine Struktur mit einem Durchmesser von 3-5 μm beschrieben, die sich aus drei Zonen voneinander separierter Proteine zusammensetzt. In der inneren Zone, dem cSMAC (*central Supramolecular Activation Cluster*), konzentrieren sich der TCR, CD2, CD4, CD8, CD28 und weitere Proteine. Umgeben wird diese zentrale Struktur von dem ringförmigen pSMAC (*peripheral Supramolecular Activation Cluster*), in dem hauptsächlich das Integrin LFA1 lokalisiert ist, das auf der Seite der APC (Antigen-präsentierende Zelle) an ICAM1 bindet. Der dSMAC (*distal Supramolecular Activation Cluster*), der eine lamellopodienähnliche Struktur besitzt und in dem starker retrograder Aktintransport und die Bildung der Mikrocluster stattfinden, ist der äußerste Bestandteil der IS.

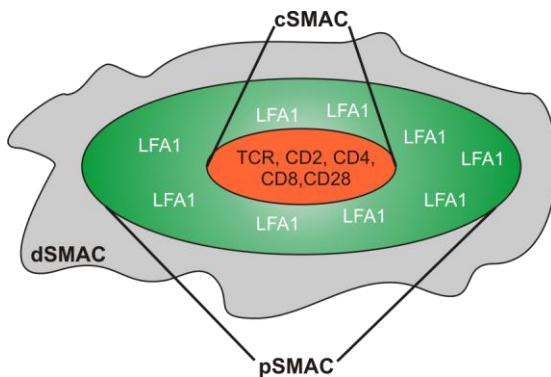


Abbildung 13 Die Struktur der Immunologischen Synapse

Die Kontaktfläche der T-Zelle mit der APC bildet die IS aus. Diese wird in drei Bereiche unterteilt; den cSMAC, den pSMAC und den dSMAC die durch ihre Proteinzusammensetzung definiert werden. Auf T-Zell-Seite sind im cSMAC vor allem der TCR, CD2, CD4, CD8 und CD28 angereichert. Im pSMAC akkumuliert LFA1 und der dSMAC besteht aus einer lamellopodien-ähnlichen Struktur.

Bei dem bis zu 24-stündigen Kontakt einer IS finden in der T-Zelle eine Vielzahl an Veränderungen auch abseits der Plasmamembran statt. So wird das Aktinzytoskelett weitreichend remoduliert (Bunnell *et al.* 2001), und sowohl MTOC (*Microtubule-Organizing-Center*) (Geiger *et al.* 1982; Kupfer 1987; Stinchcombe *et al.* 2006) als auch Mitochondrien (Quintana *et al.* 2007) werden in die Nähe des Zell-Zell-Kontaktes verlagert.

Die Untersuchung von Komponenten, die an Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind, stellt sich als sehr schwierig dar, da beide Seiten des Kontaktes biologischer Natur und daher schwer zu kontrollieren sind. Aus diesem Grund wurde ein *in-vitro*-System entwickelt, um den Zellkontakt der Immunologischen Synapse durch die Imitation eines der Partner zu initiieren. Bei der Verwendung einer *Supported Lipid Bilayer* (SLB) wird die Seite der APC nachgestellt und so eine Immunologische Synapse unter definierten Bedingungen und mit leichter Zugänglichkeit geschaffen. Im Jahr 1999 wurde eine solche aktivierende artifizielle Lipiddoppelschicht auf einer Glasoberfläche erstellt, diese mit Antigenen und Adhäsionsmolekülen beladen und eine IS mit einer T-Zelle induziert (Grakoui *et al.* 1999). Die Möglichkeit zur Modifikation der SLB wurde genutzt, um diverse Fragestellungen hinsichtlich der Dynamiken und stöchiometrischen Verteilung von Proteinen während der Ausbildung einer IS zu erforschen (Groves *et al.* 1997; Mossman *et al.* 2005; Nye & Groves 2008; Manz *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2012).

Die Auffassung über die Funktionen von Immunologischen Synapsen hat sich in den letzten Jahren verändert. Generell ordnet man der IS zwei Kategorien an Funktionen zu: Zum einen die Informationsakquisition (über die Antigene der Kontaktfläche) als Vorbereitung von Antwortreaktionen und zum anderen die darauf folgenden Effektorfunktionen wie z. B. das Ausschütten von Perforin, Granzymen und Granulysin bei zytotoxischen

T-Zellen (Dustin *et al.* 2010). Jedoch änderte sich die Auffassung vor allem zur Informationsakquisition, da mittlerweile nicht mehr nur von einer Signalinitiation und -aufrechterhaltung durch den cSMAC ausgegangen wird (Grakoui *et al.* 1999); vielmehr wird die IS nun auch als Teile einer abbauenden Struktur verstanden. Diese Auffassung wird durch die Beobachtungen unterstützt, dass innerhalb der IS Ubiquitinierung (Lee 2002; Lee 2003; Huppa *et al.* 2010) und Endozytose (Martínez-Martín *et al.* 2011) stattfinden.

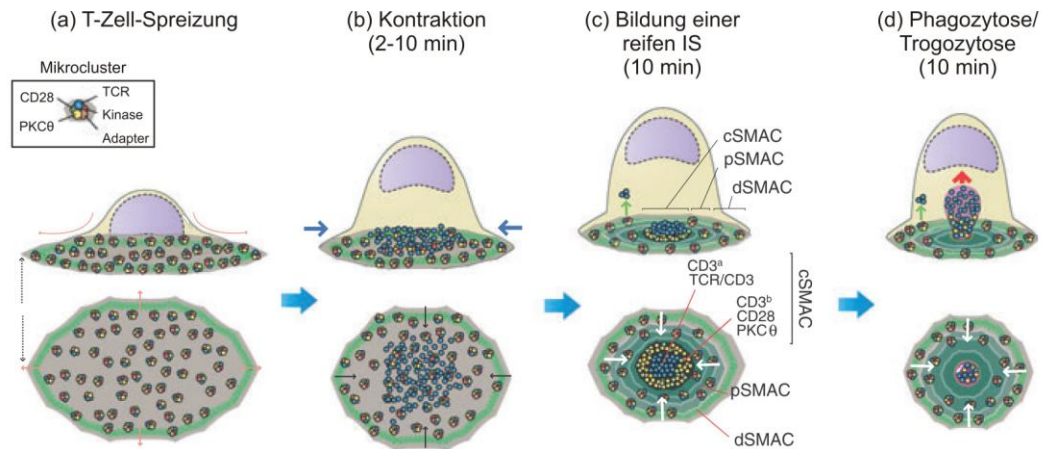


Abbildung 14 Die Immunologische Synapse als Ort der TCR-Internalisierung

Während die T-Zelle auf der stimulierenden Oberfläche adhärert und sich spreizt (a), entstehen aus den Nanoclustern des TCR die Mikrocluster, die zentripetal wandern (b). Daraus bilden sich cSMAC, pSMAC und dSMAC mit jeweils definierten Proteinzusammensetzungen (c). Schon während der Bildung der IS kommt es zur Internalisierung von Proteinen (c), die sich in der fertigen IS noch verstärkt (d). Die Darstellung wurde Alarcón *et al.* 2011 entnommen und verändert.

Neuere Erkenntnisse, nach denen die TCR-Signaltransduktion schon in Mikroclustern initiiert wird (Lee 2002) und die Stärke der Agonisten entscheidend für die Aktivität in der IS ist (Cemerski *et al.* 2008), ergeben demnach ein anderes Bild des cSMACs als fokussierendes, verstärkendes Element bei schwachen TCR-Antigen-Bindungen um trotzdem T-Zell-Aktivierung zu initiieren (Alarcón *et al.* 2011). Demnach wäre die IS nur in einer Minderzahl der Fälle für die T-Zell-Aktivierung tatsächlich notwendig.

2.2.5 Modelle der T-Zell-Aktivierung

Die T-Zell-Aktivierung erfolgt auf Grund der spezifischen, sensitiven Bindung des TCRs an sein Zielantigen-MHC-Komplex und einer darauf folgenden Signaltransduktion. Im Verlaufe der Aktivierung bildet der TCR Mikrocluster und schließlich auch in einigen Fällen die supramolekularen Cluster der IS aus. Der genaue Mechanismus der Antigenbindung und der darauf folgenden T-Zell-Aktivierung ist unklar aber ein Zusammenhang zwischen TCR-Clustergrad und Signalinitiation wird vermutet.

Die Antigenbindung des TCRs unterscheidet sich in ihren Anforderungen von den meisten anderen Rezeptor-Liganden-Bindungen. Denn einerseits muss der TCR während der T-Zell-Reifungsphase im Thymus im Prozess der positiven Selektion Selbst-Antigen-MHC-Komplexe (körpereigene Zellbestandteile) schwach binden können um das Überleben der T-Zelle zu sichern. Andererseits darf in der reifen T-Zelle im Körper die Bindung des TCR an Selbst-Antigene keine starke Aktivierung induzieren, da dies in Autoimmunität resultieren würde. Zusätzlich erschwert das hohe Verhältnis von Selbst-Antigen zu Fremd-Antigen (Zielantigen) die spezifische Antigenbindung, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (*Signal-to-noise-ratio*) dadurch sehr klein ist.

Im Folgenden werden deshalb mehrere Modelle mit Erklärungen für die Unterscheidung von Selbst-Antigenen unterschiedlicher Affinität und für die Reaktion auf kleinste Mengen von Agonisten (Zielantigen) vorgestellt. Diese begründen anhand von Mechanismen wie Aggregation, Konformationsänderungen oder Segregation das Signalverhalten des TCR.

Die ersten beiden Modelle erklären nur die allgemeine Differenzierung des TCR zwischen Antigenen und seine Sensitivität für sein spezifisches Antigen, gehen jedoch nicht auf die Weiterleitung des Signals in das Zellinnere ein. Die darauf folgenden Modelle erweitern den Fokus auch auf die Vorgänge innerhalb des TCR-Proteinkomplexes bzw. bis in die Zelle hinein.

Kinetisches Korrekturlesemodell (*kinetic proofreading*)

Das kinetische Korrekturlesemodell geht aus einer theoretischen Überlegung zu Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten des Antigens bei Interaktion mit dem TCR hervor und führt diese als Ursache für die Unterscheidung zwischen „aktivierend“ und „nicht-aktivierend“ an. In diesem Modell müssen die Antigene eine Anzahl N von Binde-Ablöse-Zyklen durchlaufen, bis der finale aktivierende Antigen-TCR-Komplex geschaffen wird. Im Laufe der Zyklen verändert sich der Antigen-TCR-Komplex immer stärker, bis eine Schwelle nach N Bindungen erreicht ist und die T-Zell-Aktivierung angestoßen wird. Durch die vielfachen intermediären Bindungen werden kleine Affinitätsunterschiede potenziert, und die Anzahl der aktivierenden Antigenbindungen wird bei nur leichtem Sensitivitätsverlust um mehrere Größenordnungen erhöht (McKeithan 1995).

Durch ein Clustern des TCR würden solche kinetischen Korrekturschritte effektiver werden, da die Binde-Ablöse-Zyklen nicht auf einen Antigen-TCR-Komplex beschränkt wären, sondern zwischen vielen verschiedenen sukzessive stattfinden könnten.

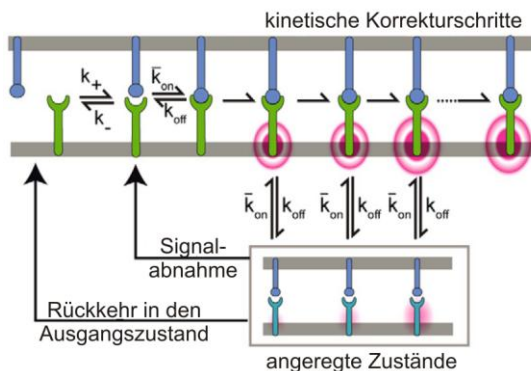


Abbildung 15 Das Kinetische Korrekturlesemodell

Der TCR bindet und löst sich mehrfach am bzw. vom Antigen-MHC-Komplex, bevor er in einen aktivierbaren Zustand übergeht (markiert durch pinkfarbene Kreise). Nach weiteren Binde-Ablöse-Zyklen wird der TCR schließlich vollständig aktiviert. Bei Ablösung des Antigen-MHC-Komplex vor endgültiger Aktivierung des TCR verbleibt dieser in einem angeregten Zustand und kann bei erneuter Bindung leichter aktiviert werden. Die Darstellung wurde aus Valitutti *et al.* 2010 entnommen und verändert.

Seriellles Aktivierungsmodell (*serial triggering*)

Dieses Modell baut auf der Beobachtung auf, dass der TCR nach Aktivierung internalisiert wird. Ein TCR, der durch Bindung eines Antigen-MHC-Komplexes aktiviert wurde, wird internalisiert, wodurch der verwaiste Antigen-MHC-Komplex die Möglichkeit hat weitere TCRs zu binden und diese zu aktivieren. Durch das serielle Binden nur eines Antigen-MHC-Komplexes könnten bis zu 200 TCRs aktiviert werden (Valitutti *et al.* 1995; Rabinowitz *et al.* 1996).

Kinetisches Segregationsmodell

Inspiziert durch den engen Zellkontakt in einer Immunologischen Synapse wurde ein Aktivierungsmodell vorgestellt, das die Mikrokompartimentierung der an der T-Zell-Aktivierung beteiligten Proteine durch Segregation auf Grund der Größe der extrazellulären Anteile postuliert (Davis & van der Merwe 2006). Bei Bindung des TCRs an sein agonistisches Peptid-MHC soll er in sehr engem Kontakt zur APC gehalten werden. Dadurch entsteht ein Bereich mit geringem extrazellulärem Raum zwischen T-Zelle und APC, und Phosphatasen wie CD45 oder CD148 werden wegen ihres großen extrazellulären Teils aus diesem Bereich ausgeschlossen. Dies ermöglicht die Phosphorylierung des TCR durch die Kinase Lck. Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass Phosphataseinhibition zu antigen-unabhängiger T-Zell-Aktivierung führt, wohingegen Phosphatasen mit verkürzter extrazellulärer Domäne die Aktivierung inhibieren (van der Merwe & Dushek 2011).

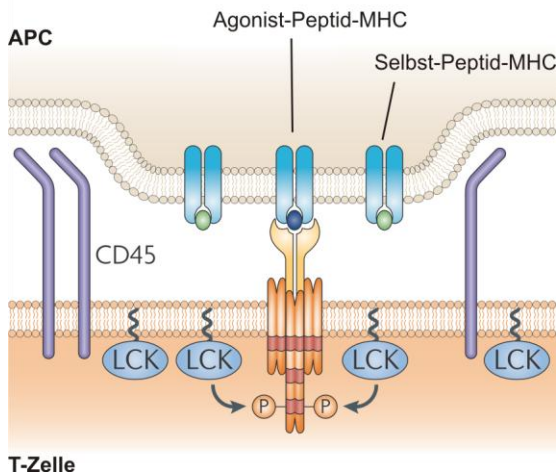


Abbildung 16 Das Kinetische Segregationsmodell

Nach dem Modell wird der TCR durch seine Bindung an einen Peptid-MHC-Komplex in einer engen Kontaktzone zwischen T-Zelle und APC gehalten, die die Phosphatase CD45 wegen ihres großen extrazellulären Teils ausschließt. Dadurch können die ITAM-Motive des TCR von Lck stabil phosphoryliert werden. Die Abbildung wurde von der Merwe und Dushek 2011 entnommen und abgeändert.

Lipid-(Membrane)-Raft-Modell

Dieses Modell basiert ebenso wie das vorherige auf der lateralen Segregation von Proteinen und wurde von Horejsí und Václav in einer Übersichtsarbeit beschrieben (Horejsí 2005).

Ausgehend von den Prinzipien des allgemeinen *Membrane-Raft*-Modells (siehe Kapitel 2.1.3, S. 12) wird die Lokalisierung der an der T-Zell-Aktivierung beteiligten Proteine in Membranmikrokompartimenten durch ihre membranverankernden Domänen begründet. Die Bedeutung der lateralen Segregation für den Einfluss auf die Phosphorylierung von CD3 und anderer Proteine des Signalweges wird von Horejsí und Václav kontrovers diskutiert.

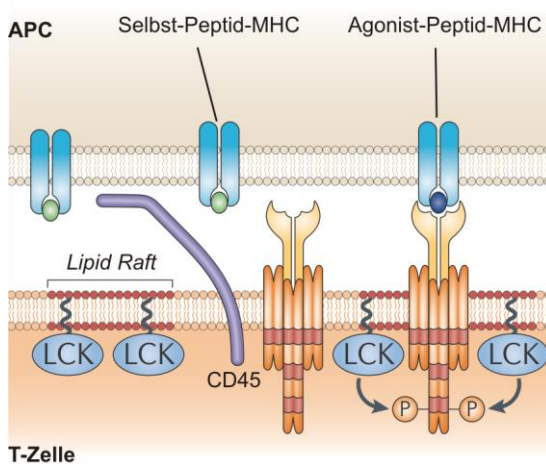


Abbildung 17 Das Lipid-Raft-Modell

Nach dem *Lipid-Raft*-Modell wird der TCR durch die Antigenbindung in *Lipid Rafts* verbracht, in denen Kinasen wie die Lck angereichert vorliegen und die Phosphatasen ausschließen. Als Folge findet Phosphorylierung des TCR statt. Die Abbildung wurde von der Merwe und Dushek 2011 entnommen und abgeändert.

Korezeptor- und Pseudodimerisierungsmodell

Diese beiden Teilmodelle fußen auf der Notwendigkeit der Korezeptorbindung bei T-Zell-Aktivierung. Das Korezeptormodell geht davon aus, dass Signalmoleküle wie z. B. die Kinase Lck durch Korezeptoren in die unmittelbare Nähe des TCR gebracht werden und dadurch dessen Aktivierung erleichtern.

Das Pseudodimerisierungsmodell schlägt hingegen vor, dass agonistische Antigen-MHC-Moleküle und Selbst-Antigen-MHC-Moleküle an benachbarte TCRs binden. Die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 sind mit dem TCR, an den das Selbst-Antigen-MHC-Molekül gebunden ist, assoziiert und interagieren mit dem agonisten-gebundenen TCR. Durch die räumliche Nähe können korezeptor-assoziierte Kinasen die Phosphorylierung des agonisten-gebundenen TCR verstärken. Dieses Modell erklärt sehr gut die T-Zell-Aktivierung bei geringer agonistischer Peptid-MHC-Konzentration auf Selbst-Antigen-dekorierten APCs (van der Merwe & Dushek 2011).

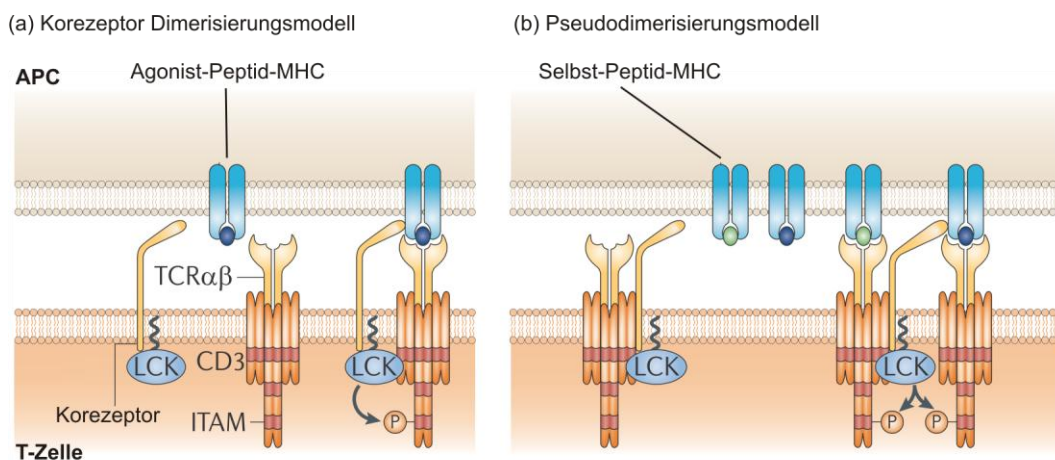


Abbildung 18 Das Korezeptor- und das Pseudodimerisierungsmodell

Das Korezeptor Heterodimerisierungsmodell (a) schlägt vor, dass die Korezeptoren mit der Kinase Lck assoziiert sind. Bei Bindung von sowohl TCR, als auch Korezeptor an einen Peptid-MHC-Komplex führt dies zur räumlichen Nähe der ITAM-Motive zu der Lck-Kinase und es kommt zur Phosphorylierung.

Für das Pseudodimerisierungsmodell (b) wird postuliert, dass durch die Bindung von TCRs an Selbst-Antigen-MHC-Moleküle (grün), in unmittelbarer Nähe zu Agonist-Peptid-MHC-

gebundenen TCRs (blau), Pseudodimere entstehen. Diese Pseudodimere konzentrieren die Lck-Kinasen und führen zur verstärkten Phosphorylierung der ITAM-Domänen.

Die Abbildung wurde von der Merwe und Dushek 2011 entnommen und abgeändert.

Kraft- bzw. Liganden-induzierte Konformationsänderung

Die Beobachtung von Konformationsänderung des TCR bei Antigenbindung liegt den letzten beiden Modellen zu Grunde. Darin werden die Kombination von Konformationsänderungen innerhalb des TCR mit kooperativen Effekten zwischen mehreren geclusterten TCRs beschrieben. Die Bindung eines Antigens an TCR $\alpha\beta$ lässt Kräfte auf Teile von CD3 einwirken und initiiert dort kolbenartige Bewegung (Sun *et al.* 2001). Diese Bewegung führt zu einer Konformationsänderung des intrazellulären Teils von CD3, wodurch sich die vorher an die Membran angelagerten und inserierten intrazellulären Teile von CD3 ζ und CD3 ϵ ablösen (Gil *et al.* 2005; Xu *et al.* 2008). Die Ablösung geht mit der Phosphorylierung der ITAMs einher (Shi *et al.* 2013). Die Konformationsänderung der antigen-bindenden TCRs führt in den Nanoclustern zur Beeinflussung der Konformation benachbarter TCRs, welche dadurch ebenfalls aktiviert werden bzw. deren Aktivierbarkeit erleichtert wird (Blanco & Alarcón 2012).

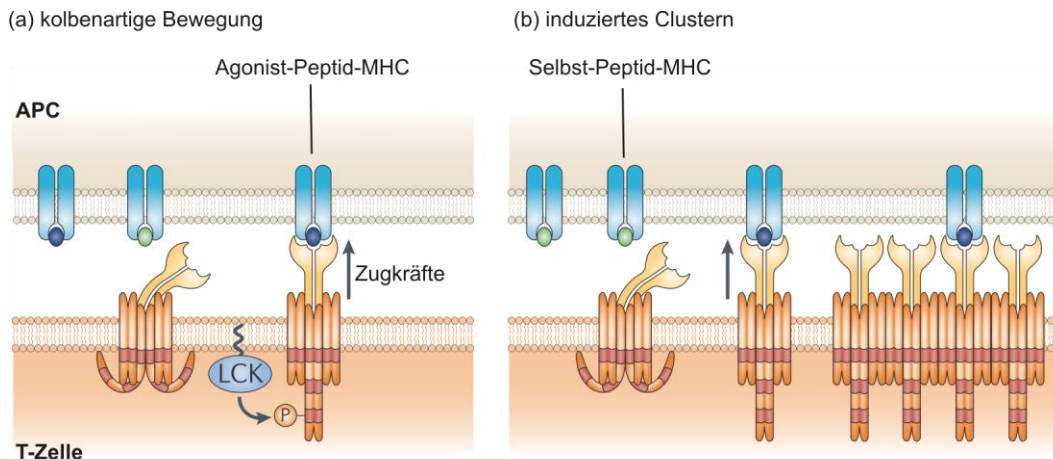


Abbildung 19 Modelle zur TCR-Aktivierung durch Konformationsänderungen

Beim Modell der kraft-induzierten Konformationsänderung (a) des TCR, wird davon ausgegangen, dass es bei Bindung des TCR an einen agonistischen Peptid-MHC-Komplex zu Zugkräften auf den TCR kommt. Dies bewirkt eine kolbenartige Bewegung von CD3

wodurch die intrazellulären ITAM-Motive zugänglich für die Lck-Kinase werden und phosphoryliert werden können. Das weitreichendere zweite Modell (b) postuliert eine Konformationsänderung des TCR durch Ligandenbindung, die zu einem Clustern mit benachbarten Rezeptoren führt. Das Clustern von liganden-gebundenen mit -ungebundenen TCRs führt auch in den ungebundenen TCRs zu Konformationsänderungen und erleichtert somit deren Aktivierbarkeit. Veränderte Abbildung aus van der Merwe und Dushek 2011.

Die exakten Mechanismen, die zur hohen spezifischen und sensitiven Bindung des TCR an sein agonistisches Antigen führen, sind noch nicht ausreichend geklärt. Doch zeigt sich, dass bei der T-Zell-Aktivierung ein komplexes Wechselspiel zwischen TCR, Peptid-MHC-Komplexen, Korezeptoren und Einflüssen aus der Umgebung herrscht. In jedem Fall zeichnet sich ein Bild der T-Zell-Aktivierung ab, in dem die Kooperation mehrerer TCRs bzw. das Clustern von Proteinen einen hohen Stellenwert einnimmt.

3 Zielsetzung

Der T-Zell-Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle bei der adaptiven Immunantwort des Körpers. Dabei ist er an komplexen zellulären Signalvorgängen beteiligt und interagiert mit Komponenten der ihn umgebenden Membran. Er weist verschiedene Clustergrade in Abhängigkeit der Bindung an Liganden auf. Dieser Zusammenhang zwischen Clustergrad und Aktivierungszustand wirft Fragen nach den grundsätzlichen TCR-Clustermechanismen auf.

Deshalb sollten als Ziel dieser Arbeit die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf den TCR-Clustergrad getestet werden um die Verbindungen von prinzipiellem Membranaufbau, TCR-Clustergrad und T-Zell-Aktivierung besser verstehen zu können.

Dazu sollte als Erstes das beschriebene TCR-Clustern in aktivierten bzw. nicht-aktivierten T-Zellen auf festen oder dynamischen Oberflächen verifiziert werden.

Als zweiter Punkt sollte untersucht werden, ob zytosolische Teile des TCR, genauer die Domänen von CD3 ζ , Einfluss auf das Clusterverhalten haben. CD3 ζ wurde wegen seiner ITAM-Motive gewählt, da diese hauptsächlich für die Signaltransduktion des TCR verantwortlich sind.

Und zu prüfen wie sehr der *second messenger* Ca²⁺ über elektrostatische Wechselwirkungen das TCR-Clustern modifiziert, sollten die Auswirkung verschiedener Ca²⁺-Konzentrationen auf native Membranpräparationen (*Membrane Sheets*) getestet und analysiert werden.

Desweiteren sollten die Einflüsse von Glykolipiden, die mit der T-Zell-Aktivierung in Verbindung gebracht werden, mit GM1 als Indikatorlipid untersucht werden. Dafür sollte ein System zur unmittelbaren Verminderung der Glykolipidlevel in nativen Membranen entwickelt werden.

Schließlich sollte als vierter Punkt die extrazelluläre Domäne von CD3 ζ schrittweise deletiert werden und die Auswirkungen dieses Eingriffs auf die Funktion des kurzen, hochkonservierten Peptids geklärt werden.

Die so gewonnenen Ergebnisse sollten genutzt werden, um das TCR-Clustern im Gesamtzusammenhang der T-Zell-Aktivierung einordnen zu können und vorhandene Modellvorstellungen zu verfeinern.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen *Bio-Rad* (München, Deutschland), *Fermentas* (St. Leon-Rot, Deutschland), *Merck* (Darmstadt, Deutschland), *Promega* (Mannheim, Deutschland), *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma-Aldrich* (Hamburg, Deutschland) oder *Avanti polar lipids* (Alabaster, USA) gekauft. Chemikalien anderer Hersteller werden kenntlich gemacht. Alle Chemikalien entsprachen der Qualitätsstufe p.a..

4.1.1 Mikroskopie und Zubehör

Mikroskope

Olympus IX81 Mikroskop (*Olympus*, Hamburg, Deutschland) mit 60-fach 1,49 NA Apochromat Objektiv und zusätzlichen Nachvergrößerungen 1,6-fach und 2- oder 4-fach. Angeschlossen war eine 16 bit EMCCD Kamera (16 x 16 μm^2 Pixelgröße, *ImagEM C9100-13*, *Hamamatsu Photonics*, Hamamatsu, Japan) und ein 488 nm Argon-Laser (*LAS/488/20*, *Olympus*, Hamburg, Deutschland) im TIRF-Modus und eine 150 W MT20-Xenon-Lampe (*Olympus*, Hamburg, Deutschland). Als Filtersets wurden das F36-500 DAPI HC-Filterset, das F36-525 EGFP HC-Filterset und das F36-503 TRITC HC-22 Filterset (alle von *AHF Analysentechnik*, Tübingen, Germany) verwendet. Die CellR® Software wurde für die Bildaufnahme benutzt.

Zur Überprüfung von Transfektionseffizienzen und der Erstellung von *Membrane Sheets* wurde das **Zeiss Axio Observer D1** benutzt, genauer beschrieben in Zilly *et al.* 2011.

Für die konfokale Mikroskopie wurde das **Olympus FluoView™ FV1000** laser scanning microscope mit UPlanSApo 60x NA 1.35 Objektiv und 488 nm sowie 543 nm Laser verwendet (AG Kolanus, LIMES-Institut, Uni Bonn).

Zubehör

FCS2 Starter Set (#060319-2, Bioptechs, Butler, USA) enthält: FCS2 Kammer, Steuergerät, Mikroaquädukte und Dichtungen.

Deckgläser

Runde Deckgläser No. 0, Durchmesser 25 mm (#0110650, *Marienfeld*, Lauda-Königshofen, Deutschland).

Runde Deckgläser No. 1,5, Durchmesser 40 mm (#40-1313-0319, *Bioptechs*, Butler, USA).

4.1.2 Pufferlösungen

Die Zusammensetzungen der Standardpuffer sind hier angegeben. Falls es Abweichungen in den einzelnen Experimenten bei der Verwendung der angegebenen Puffer gab, ist dies gesondert beschrieben.

Poly-L-Lysin (PLL)-Vorratslösung

2 mg/ml PLL wurde in Aqua bidest. gelöst und als 1,5 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

4x Sheet Puffer – Vorratslösung

480 mM Kaliumglutamat, 80 mM Kaliumacetat, 40 mM EGTA, 80 mM HEPES-KOH, pH 7,2. Das Einstellen des pH-Werts erfolgte mit KOH.

Sheet-Puffer

120 mM Kaliumglutamat, 20 mM Kaliumacetat, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES-KOH, pH 7,2.

K-Glu-Puffer ohne EGTA

120 mM Kaliumglutamat, 20 mM Kaliumacetat, 20 mM HEPES-KOH, pH 7,2.

DPTA–Vorratslösung (250 mM -> 125x)

Um eine 250 mM DPTA- (1,3-Diamino-2-hydroxypropane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) Lösung zu erhalten wurden 0,4025 g DPTA abgewogen und mit 2 ml Aqua bidest. und 3 ml 1 M KOH auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. pH 7,2

Ca²⁺-DPTA–Vorratslösung (250 mM -> 125x)

Um eine 250 mM DPTA- und 250 mM Ca²⁺-Vorratslösung zu erhalten, wurden 0,4025 g DPTA und 0,1387 g CaCl₂ abgewogen und mit 2 ml Aqua bidest. und 3 ml 1 M KOH auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. pH 7,2

Ringerlösung

130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 48 mM D(+)-Glukose und 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4

10x PBS (*Phosphate Buffered Saline*) – Vorratslösung

1,37 M NaCl, 27 mM KCl und 81 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,2

16%ige Paraformaldehyd - Vorratslösung

Unter dem Abzug wurden 16 % (w/v) PFA in ddH₂O bei 60 °C gelöst und 10 Tropfen 1 N NaOH-Lösung hinzugegeben. Die Lösung kühlte auf RT ab und wurde mit Wasser aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die mittelfristige Lagerung erfolgte in Aliquots zu 12,5 ml bei -20 °C.

Paraformaldehyd Fixierlösung

Um Proben zu fixieren wurde die Vorratslösung mit 1/10 10x PBS-Vorratslösung und ddH₂O auf 4 % (w/v) verdünnt und der pH-Wert von 7,2 kontrolliert.

Zytomix

120 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 0,15 mM CaCl₂, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ und 25 mM HEPES, pH 7,6 (Der pH-Wert wurde mit KOH eingestellt)

TMA-DPH-Lösung

Experiment-spezifische Pufferlösungen wurden mit 1-(4-Trimethyl-Ammoniumphenyl)-6-Phenyl-1,3,5-Hexatrien p-Toluolsulfonat (TMA-DPH; #T204, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) gesättigt. Die Lösung wurde 3 min bei 17000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 3 min bei 17000 x g zentrifugiert. Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wurde in der Mikroskopie im Verhältnis 1 zu 3 verwendet um lipophile Fraktionen zu markieren (z. B. die Plasmamembran und/oder *Membrane Sheets*).

200 mM PMSF-Lösung (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Abgewogenes PMSF wurde in Isopropanol gelöst und bei 4 °C bis zu neun Monaten gelagert.

10x Binde-/Waschpuffer 1

3 M NaCl, 500 mM NaH₂PO₄, 10 mM PMSF, den experimentell bestimmten optimalen pH-Wert einstellen (meist zwischen pH 6-9).

Binde-/Waschpuffer 1

10x Puffer wurde verdünnt und der gewünschte pH-Wert eingestellt.

Lysis-/Bindepuffer 2

150 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 7, 10 % [v/v] Glycerol, 1 % [v/v] TritonX-100, 1 mM PMSF, 1 Tablette Complete® EDTA frei/100 ml Puffer (#05056489001, Roche, Mannheim, Deutschland), 100 µg/ml Lysozym.

Wasch-/Elutionspuffer 2

150 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH 7, 1 Tablette Complete® EDTA frei pro 100 ml Puffer, 1 mM PMSF. Imidazolkonzentration wurde jeweils eingestellt (20 mM, 50 mM, 70 mM und zur Elution 300 mM).

4x Laemmli-Probenpuffer

250 mM Tris pH 6,8, 30 % [v/v] Glycerol, 6 % [w/v] SDS, 0,04 % [w/v] Bromphenolblau. Der Puffer wurde bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch falls benötigt 1:5 β-mercaptoethanol hinzugegeben.

HBS (*Hepes Buffered Saline*)

140 mM NaCl, 21 mM Hepes, 6 mM D-Glukose, 5 mM KCl, 750 µM NaH₂PO₄, pH 7,05 (Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH eingestellt und der Puffer anschließend steril filtriert).

HBS*

HBS mit 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ und 11 mM D-Glukose.

4.1.3 Zellkulturmedien

Jurkat E6.1

RPMI-1640 mit Phenol-Rot (#E15-840, PAA, Pasching, Österreich), 10 % (v/v) FCS Superior (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml) (#P11-010, PAA, Pasching, Österreich).

Hek293 EBNA

DMEM Glc 4.5 g/l mit L-Gln mit Phenol-Rot (#E15-810, PAA, Pasching, Österreich), 10 % (v/v) FCS Superior (*Biochrom AG*, Berlin, Deutschland), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml) (#P11-010, PAA, Pasching, Österreich).

Hek293 EBNA Selektionsmedium

Wie Hek293EBNA Medium jedoch zusätzlich mit 1 µg/ml Puromycin (#P11-019, PAA, Pasching, Österreich).

PC12

DMEM Glc 4.5 g/l mit L-Gln mit Phenol-Rot (#E15-810, PAA, Pasching, Österreich), 5 % (v/v) FCS Superior (*Biochrom AG*, Berlin, Deutschland), 10 % (v/v) HBS (*Biochrom AG*, Berlin, Deutschland) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml) (#P11-010, PAA, Pasching, Österreich).

HepG2

EMEM (#BE12-662F, *Lonza*, Verviers, Belgien), 10 % (v/v) FCS Superior (*Biochrom AG*, Berlin, Deutschland), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 100 x (Penicillin 10.000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml) (PAA, Pasching, Österreich).

PBS⁻

Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (#H15-002, PAA, Pasching, Österreich).

Trypsin

Trypsin EDTA (1x), 0,05 % / 0,02 % in DPBS (#L11-004, PAA, Pasching, Österreich).

4.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

α -SNAP-25(CL.71.1): monoklonales Mäuse IgG (#111011, SYSY, Göttingen, Deutschland)

α -TCR α (T-20): polyklonales Ziege IgG (#sc-31275, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -His-probe (AD1.1.10): monoklonales Mäuse IgG (#sc-53073, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -CD3- ζ (C-20): polyklonales Ziege IgG (#sc-1124, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -GFP: monoklonales Mäuse IgG (#sc-9996, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -CD3- ϵ (Okt3): monoklonales Mäuse IgG (AG Kolanus, LIMES Institut, Universität Bonn, Deutschland)

α -CD3- ϵ -biotin (biotin anti-human CD3 (OKT3)): monoklonales Mäuse IgG (13-0037-80, eBioscience (NatuTec), Frankfurt, Deutschland)

α -CD3- ζ (G-3): monoklonales Mäuse IgG (#sc-59012, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -CD3- ϵ : monoklonales Mäuse IgG (#550368, BD, Heidelberg, Deutschland)

α -RFP: polyklonales Kaninchen IgG (#ab28664, Abcam, Cambridge, UK)

α -CD28-biotin (Biotin anti-human CD28): monoklonales Mäuse IgG (#302903, Biolegend, Fell, Deutschland)

α -CD3- ϵ (Biotin anti-human CD3 Antibody Hit3a): monoklonales Mäuse IgG (#300303, Biolegend, Fell, Deutschland)

α -GFP (FL): polyklonales Kaninchen IgG (#sc-8334, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -Clathrin HC (C-20): polyklonales Ziegen IgG (#sc-6579, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -GRP78(H-129): polyklonales Kaninchen IgG (#sc-13968, Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA)

α -EEA1 (H-300): polyklonales Kaninchen IgG (#sc-33585, *Santa Cruz biotechnology Inc.*, Santa Cruz, USA)

α -KDEL (10C3): monoklonales Mäuse IgG (#ab12223, *Abcam*, Cambridge, UK)

α -Rab5: polyklonales Kaninchen IgG (#ab18211, *Abcam*, Cambridge, UK)

α -GRP78 BiP: polyklonales Kaninchen IgG (#ab21685, *Abcam*, Cambridge, UK)

α -LAMP1 (H4A3): monoklonales Mäuse IgG (#ab25630, *Abcam*, Cambridge, UK)

α -Rab11: polyklonales Kaninchen IgG (#ab3612, *Abcam*, Cambridge, UK)

α -CD3- ϵ (Okt3): monoklonales Mäuse IgG (#16-0037, *eBioscience (NatuTec)*, Frankfurt, Deutschland)

Sekundäre Antikörper

AlexaFluor® **488 Esel α -Maus IgG** (#A21202, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **488 Ziege α -Kaninchen IgG** (#A11034, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **488 Esel α -Kaninchen IgG** (#A21206, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **488 Esel α -Ziege IgG** (#A11055, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **555 Ziege α -Kaninchen IgG** (#A21429, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **594 Esel α -Maus IgG (H+L)** (#A21203, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **594 Esel α -Ziege IgG (H+L)** (#A11058, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

AlexaFluor® **594 Esel α -Kaninchen IgG** (#A21207, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland)

Ziege **α -Maus IRDye®800CW** (#926-32210, *LI-COR*, Bad Homburg, Deutschland)

Ziege **α -Maus IRDye®680CW** (#926-32220, *LI-COR*, Bad Homburg, Deutschland)

Ziege **α -Kaninchen IRDye®800CW** (#926-32211, *LI-COR*, Bad Homburg, Deutschland)

Ziege **α -Kaninchen IRDye®680CW** (#926-32221, *LI-COR*, Bad Homburg, Deutschland)

Esel **α -Ziege IRDye®800CW** (#926-32214, *LI-COR*, Bad Homburg, Deutschland)

4.1.5 Zelllinien

Jurkat E6.1

Jurkat E6.1 sind humane leukämische T-Zell-Lymphoblasten, die aus der Jurkat FHCRC-Zelllinie durch Inkubation bei 41 °C für 48 h gewonnen wurden. Die Zelllinie wurde ursprünglich aus dem peripheren Blut eines an T-Zell-Leukämie erkrankten 14-jährigen Jungen gewonnen. Ein Aliquot wurde freundlicherweise von der AG Kolanus, LIMES-Institut, Uni Bonn, zur Verfügung gestellt. Ein Weiteres wurde bei der Firma *Sigma-Aldrich* gekauft (#88042803, ECACC; *Sigma-Aldrich*, Hamburg, Deutschland).

Die Zellen wurden alle drei Tage auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in 70 % RPMI/Pen-Strep, 20 % FCS und 10 % DMSO in 1 ml Aliquots zu 5×10^6 Zellen eingefroren. Die Lagerung erfolgte in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

HepG2

Die humanen HepG2-Zellen stammen aus einem hepatozellulären Karzinom (#HB-8065; ATCC).

Die Zellen wurden alle 4-5 Tage bei einer Konfluenz von ca. 70 % im Verhältnis 1 zu 4 subkultiviert. Bei der Langzeitlagerung über flüssigem Stickstoff betrug die Konzentration $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml.

Hek293 EBNA

Die Hek293 EBNA Zellen wurden freundlicherweise von PD. Dr. Frank Zaucke (Institut für Biochemie II, Köln) zur Verfügung gestellt. Die Zellen werden von der Firma Invitrogen vertrieben (#R620-07, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland). Die Zelllinie ist für die Proteinexpression optimiert. Sie exprimiert stabil das Epstein Barr Virus (EBV) *EBNA-1* Gen des Plasmids pCMV/EBNA. Bei Transfektion mit einem den EBV-Replikationsursprung (OriP) enthaltenden Plasmid, wird dieses bei Proliferation episomal weitergegeben (Young *et al.* 1988). Die Ursprungszelllinie war HEK-293 (ATCC: CRL-1573).

Hek293 EBNA Zellen wurden alle 3-4 Tage bei Erreichen von 85 % Konfluenz im Faktor 1:5 bis 1:10 passagiert.

PC12

Die Zelllinie stammt aus einem Pheochromocytoma der Nebenniere einer bestrahlten Ratte (*rattus norvegicus*) (Heumann *et al.* 1983)(ATCC: CRL-1721). Die Zellen wurden alle 3-4 Tage bei 80 % Konfluenz subkultiviert in einem Verhältnis von 1:3.

4.1.6 DNS-Konstrukte (nicht selbst erstellt)

Zwischen- und Zielvektoren

pEGFP-C1 (#6084-1, *Clontech*, Mountain View, USA)

pGEM®-T Easy Vector (*Promega*, Madison, USA)

pET-15b (#69661, *Merck*, Darmstadt, Deutschland)

pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.* 1997)(siehe Abbildung 21, erhalten von PD. Dr. Frank Zaucke, Institut für Biochemie II, Köln)

4.1.7 Verwendete Kits

RNeasy Mini Kit (#74104, *Qiagen*, Hilden, Deutschland)

OneStep RT-PCR Kit (#210210, *Qiagen*, Hilden, Deutschland)

NucleoSpin ExtractII (#740609, *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland)

NucleoSpin Plasmid (#740588, *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland)

NucleoBond PC500 (#740574, *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland)

pGEM®-T-Easy Vector System I (#A1360, *Promega*, Madison, USA)

BCA Protein Assay Reagent (#23225, *Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products*, Rockford, USA)

4.2 Methoden

4.2.1 Klonierung

Die Klonierungen wurden nach Standardmethoden durchgeführt, wie z. B. beschrieben in Mülhardt 2009, Sambrook und Russell 2006 oder Sambrook *et al.* 2001.

Fluoreszenzmarkierte CD3-Konstrukte

Aus Jurkat E6.1-Zellen wurde die RNS mittels des RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Diese wurde benutzt, um mit dem OneStep RT-PCR Kit (#210210, Qiagen, Hilden, Deutschland) und spezifischen *Primern* (Oligonukleotide als DNS-Polymerase Startermolekül) das jeweilige Transkript zu amplifizieren (CD3 ζ : NM_198053, CD3 δ : NM_000732, CD3 ϵ : NM_000733, CD3 γ : NM_000073). Die Transkripte wurden per TA-Klonierung (pGEM®-T-Easy Vector System I) in einen Zwischenvektor eingefügt. Mit Hilfe von Fusions-PCRs wurden die Transkripte mit der DNS-Sequenz von fluoreszierenden Proteinen (mEGFP, mRFP, mCherry, PA-mCherry) als chimäre Proteine ohne Verbindungsstücke (Linkersequenz) verbunden und erneut in den Zwischenvektor eingefügt. Durch Verdau des Zwischen- (pGEM®-T Easy Vektor) und Endvektors (pEGFP-C1 als Basis) mit NheI und KpnI und Ligation der Fragmente wurden die Zielvektoren generiert. Diese wurden bei der GATC-Biotech-AG (Konstanz, Deutschland) sequenziert.

Deletionsmutanten wurden generiert, indem per PCR entsprechend kleinere Stücke des ORFs (*Open Reading Frame*) amplifiziert wurden und per Fusions-PCR mit einem fluoreszierenden Protein verbunden wurden. Substitutionsmutanten (z. B. CD3 ζ -EC(TEV)-mEGFP, Abbildung 44) wurden per PCR mit komplementären, sequenzverändernden *Primern* und anschließender Fusions-PCR hergestellt.

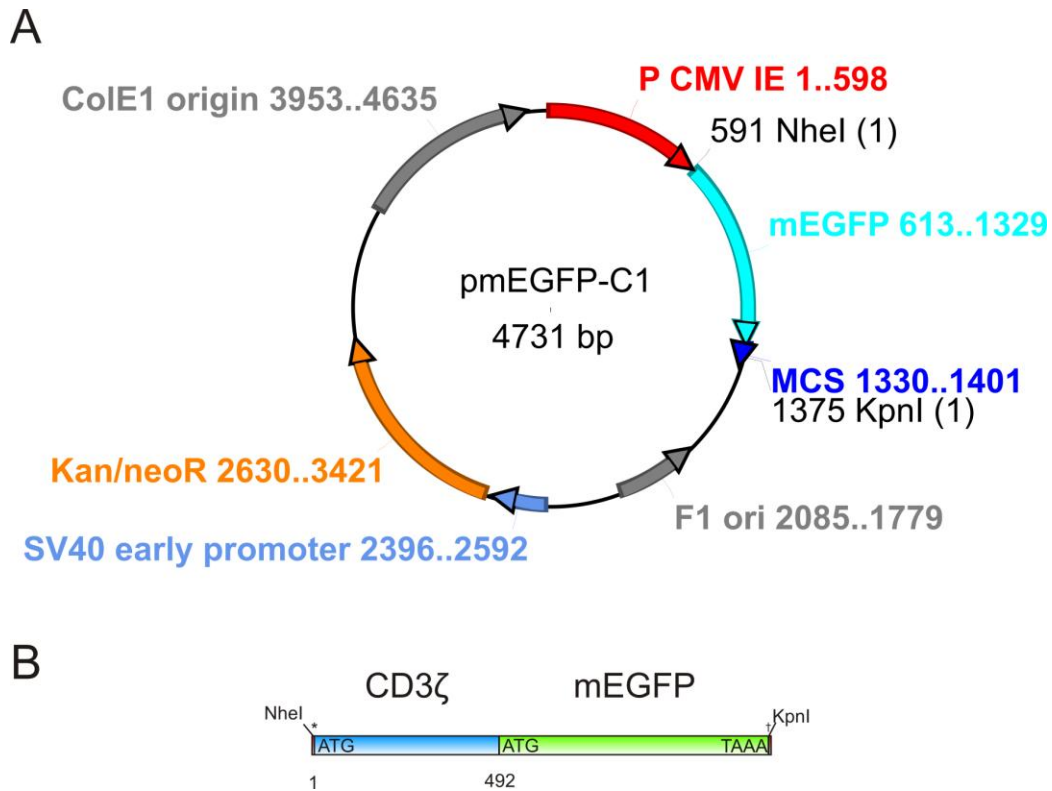


Abbildung 20 Expressionsvektorkarte für Säugetierzellen und repräsentatives Konstrukt

(A) Vektorkarte von pmEGFP-C1 (P CMV IE; *human cytomegalovirus immediate early Promotor*, mEGFP; *monomeric enhanced green fluorescent protein*, MCS; *multiple cloning site*, F1 ori; *F1 origin*, Kan/neoR; *Kanamycin-/Neomycin resistance*, ColE1 origin; *colicin E1 origin*) (Erstellt mit ApE: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/apel/>; 20.03.13).

(B) Repräsentatives CD3 ζ -WT-mEGFP als Schema des ORF (*Open Reading Frame*).

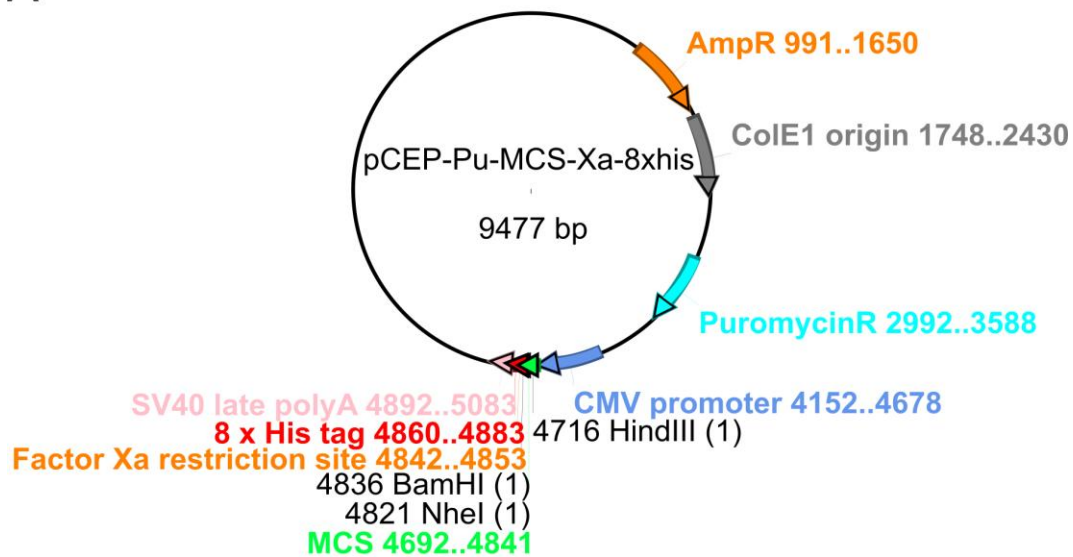
* = Startnukleotid, † = Endnukleotid. CD3 ζ -WT hat 492 Nukleotide.

ICAM1-Konstrukte

Die Nukleotidsequenz von ICAM1 (NM_000201) wurde per RT-PCR aus Jurkat E6.1 RNS amplifiziert. Dabei wurde die häufig vorkommende (Iwao *et al.* 2001) natürliche Variante K469E (Rs5498) des Proteins verwendet. ICAM1 wurde am 5'-Ende mit einer HindIII-Schnittstelle und vor der Transmembrandomäne mit einer BstBI- bzw. einer BamHI-Schnittstelle amplifiziert. So wurde eine trunkierte Version des Proteins erstellt, die ausschließlich aus dem extrazellulären Teil besteht (ICAM1-ΔTMR).

Um ein chimäres, GFP-markiertes ICAM1 zu erhalten, wurde zusätzlich zur BstBI-Sequenz an das 3'-Ende des ICAM1-ΔTMR der komplementäre Anfangsteil von mEGFP angefügt. In der Sequenz des mEGFP wurde per PCR eine stille Mutation zur Inserierung einer BstBI-Schnittstelle eingebracht und an das 3'-Ende eine NheI-Schnittstelle angefügt. Ein pCEP-Pu-Vektor (Kohfeldt *et al.* 1997)(siehe Abbildung 21, erhalten von PD. Dr. Frank Zaucke Institut für Biochemie II, Köln), wurde mit HindIII/NheI geschnitten, und mit *HindIII*-ICAM1-*BstBI* und *BstBI*-mEGFP-*NheI* Fragmenten ligiert.

A



B

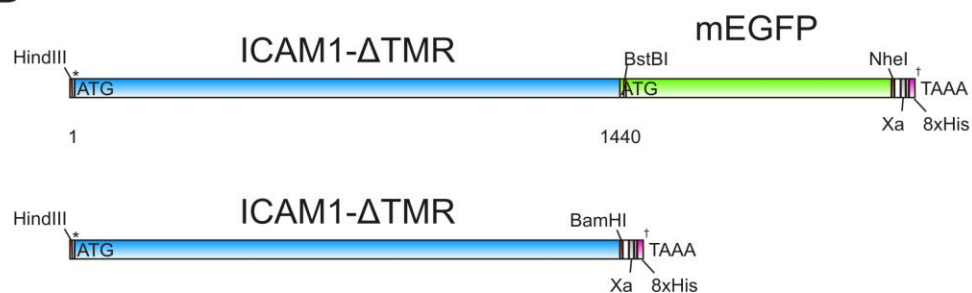


Abbildung 21 Vektorkarte und Schema zu dem ICAM1-ΔTMR-mEGFP-Xa-8xHis Konstrukt

(A) Vektorkarte pCEP-Pu (Kohfeldt *et al.* 1997). (CMV; *human cytomegalovirus Promotor*, MCS; *Multiple Cloning Site*, PuromycinR; *puromycin resistance*, ColE1 *origin*; *colicin E1 origin*, 8xHis tag; Okta-Histidin tag) (Erstellt mit ApE: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/apE/>; 20.03.13).

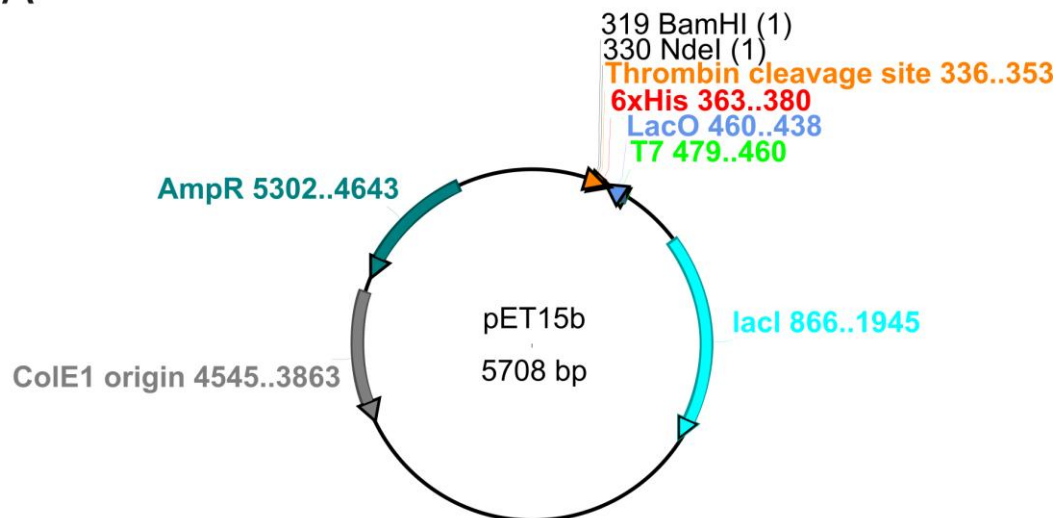
(B) ORF von ICAM1-ΔTMR-mEGFP-Xa-8xHis mit stiller Mutation für eine BstBI-Schnittstelle im 5'-Bereich des mEGFP. ORF des ICAM1-ΔTMR-Xa-8xHis.

* = Startnukleotid, † = Endnukleotid. ICAM1-ΔTMR besteht aus 492 Nukleotiden.

GLTP-Konstrukte

Die Nukleotidsequenz von GLTP (NM_016433) wurde von Dr. Ines Lauria (mit Hilfe von Daiwei Zheng und Esmina Mjumjunov-Crncevic) per RT-PCR aus HepG2-RNS amplifiziert und über den pGEM®-T Easy Zwischenvektor per NdeI- und BamHI-Schnittstellen in den pET15b (#69661, Merck, Darmstadt, Deutschland) Vektor inseriert. Die Mutanten GLTP-W96A und GLTP-W142A wurden per Fusions-PCR mit überlappenden *Primern* generiert. Dabei enthielten die *Primer* den Nukleotidaustausch (siehe Lauria *et al.* 2013).

A



B



Abbildung 22 Vektorkarte und Schema zu dem 6xHis-Thrombin-GLTP-Konstrukt

(A) Vektorkarte pET15b (T7; T7 Promotor, AmpR; *ampicilin resistance*, ColE1 *origin*; colicin E1 *origin*, 6xHis tag; Hexa-Histidin tag, lacI; *lac repressor*) (Erstellt mit ApE: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/apE/>; 20.03.13).

(B) ORF von 6xHis-Thrombin-GLTP.

* = Startnukleotid, † = Endnukleotid. GLTP hat 630 Nukleotide.

mCherry-tSH2(ZAP70)-Konstrukt

Von einem prK5-Flag-Zap70wt-Plasmid (freundlicherweise von Dr. Jessica Grell, AG Kolanus, LIMES-Institut zur Verfügung gestellt) wurden die Nukleotide 1-768 von ZAP70 (NM_001079) mit 5'EcoR und 3'BamHI amplifiziert um beide SH-Domänen zu erhalten (vergleiche Folmer *et al.* 2002). Diese Sequenz wurde in den Vektor pmCherry-C1 (wie pmEGFP-C1 Abbildung 20 mit mCherry statt mEGFP) kloniert. Dadurch entstand wie bei Yudushkin und Vale 2010 ein mCherry-tSH2(ZAP70)-Konstrukt mit einer Linker-Region (SGLRSRAQASNS) zwischen mCherry und tSH2(ZAP70). Das Konstrukt wies eine stille Mutation G507A auf (Thr169->Thr).

4.2.2 Behandlung von Deckgläser

Hydroxylierung der Glasoberfläche durch *Piranha Solution*

Hydroxylierung von Glasoberflächen erleichtert die Fusion von Vesikeln und somit die Ausbildung einer *Supported Lipid Bilayer* (Hull *et al.* 2005). In Seu *et al* 2007 wurde gezeigt, dass kurzes Ätzen genügt, um hohe Fluidität in künstlichen Lipidmembranen zu erzeugen.

Die Behandlung von Deckgläsern mit *Piranha Solution* wurde mit säurefester Sicherheitsbekleidung unter einem Abzug durchgeführt. 96%ige H₂SO₄ wurde im Verhältnis 4:1 mit 30%igem H₂O₂ in einem PTFE-Becherglas gemischt. Die Deckgläser wurden einzeln mit PTFE-Pinzetten in die heiße, ausgasende Lösung gegeben und 15 min darin inkubiert, unterbrochen von zweimaligem Auflockern und Durchmischen der Deckgläser. Danach wurde die *Piranha Solution* fachgerecht entsorgt und die Deckgläser zweimal gründlich mit je 500 ml Aqua bidest. gewaschen. Die Deckgläser wurden einzeln in ein Becherglas mit 500 ml Aqua bidest. gegeben, um letzte Rückstände abzuwaschen und zu verdünnen. Nach weiteren zwei Waschschritten wurden die Deckgläser einzeln auf Papiertüchern bei 65 °C getrocknet und anschließend gelagert.

Beschichtung von Deckgläsern mit Poly-L-Lysin (PLL)

Für die Mehrzahl der Versuche wurden runde Deckgläser der Stärke No. 0 (#0110650, *Mariefeld*, Lauda-Königshofen, Deutschland) mit einem Durchmesser von 25 mm verwendet. Diese wurden gereinigt indem 500 Deckgläser in einem 1 l-Becherglas für 2 h schüttelnd in 200 ml 1 M HCl inkubiert wurden. Anschließend wurden sie fünfmal mit Aqua bidest. gewaschen und weitere 2 h mit 200 ml 1 M NaOH schüttelnd inkubiert. Nach weiteren fünf Waschschritten in Aqua bidest. wurde mit 200 ml 100 % Ethanol absolut geschüttelt und der Alkohol anschließend abgeschüttet. Die gereinigten Deckgläser wurden in eine Instrumentenschale überführt, autoklaviert und anschließend bei 70 °C getrocknet. Die PLL-Vorratslösung wurde im Verhältnis 1:20 mit Aqua bidest. verdünnt. Unter einer sterilen Werkbank wurden die Deckgläser in 6-well Platten überführt und für 30 min bei RT mit je 500 µl der angesetzten 100 µg/ml PLL-Lösung inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Deckgläser für mindestens 2 h unter sterilen Bedingungen getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Beschichtung von Deckgläsern mit aktivierenden Antikörpern

Um T-Zellen zu aktivieren kann man artifiziell den TCR durch Antikörper quervernetzen und dadurch einen aktivierenden Stimulus setzen (Verwilghen *et al.* 1991). Um Deckgläser immunologisch aktivierend zu machen, werden sie mit 5 µg/ml OKT3 (siehe 4.1.4) in PBS oder 50 mM TRIS pH 9,5 für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und bei 4 °C für nicht mehr als 24 h gelagert oder sofort Zellen darauf gegeben.

4.2.3 Zellkultur

Allgemeine Arbeiten mit Zelllinien wurden nach Standardmethoden wie bei Schmitz 2009 beschrieben durchgeführt. Das Standardarbeitsmaterial wurde von *Sarstedt* (Nürnbrecht, Deutschland) und *Labomedic* (Bonn, Deutschland) bezogen. Es wurden wie in 4.1.5 beschrieben die Zelllinien Jurkat E6.1, HepG2, Hek293t EBNA und PC12 verwendet.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärente Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und mit 2 ml Trypsin abgelöst. Das Trypsin wurde mit 8 ml Medium/FCS kompetitiv inhibiert. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und in Einfriermedium (70 % Medium, 20 % FCS, 10 % DMSO) mit verschiedenen Zellkonzentrationen (Jurkat E6.1: 5×10^6 Zellen/ml, Hek293EBNA: 1×10^7 Zellen/ml, PC12: 2×10^6 Zellen/ml, HepG2: $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) resuspendiert. Nicht-adhärente Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und in der entsprechenden Konzentration in Einfriermedium resuspendiert. Von den resuspendierten Zellen wurde 1 ml in ein 2 ml Cryoröhrchen überführt und mit Hilfe eines „Nalgene Cryo Containers“ (#C1562-1EA, Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) bei -80 °C über Nacht abgekühlt. Danach wurden die Zellen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Cryoröhrchen dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C 2 min aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 9 ml vorgewärmten Medium gewaschen und die Zellen in warmes Medium in geeigneter Zellkonzentration überführt.

Passagieren von Zellen

Nicht-adhärente Zellen wurden gezählt, benötigtes Zellsuspensionsvolumen entnommen und 3 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und anschließend in definiertem Volumen an Medium aufgenommen (Jurkat E6.1 2×10^5 Zellen/ml).

Adhärenz Zellen wurden mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und danach mit 2 ml Trypsin 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurden sie mit Medium/FCS gewaschen, vereinzelt und verdünnt in definierter Zahl ausgesät.

Transfektion von Zellen

Jurkat E6.1-Zellen wurden per Elektroporation transfiziert. Dafür wurden je 1×10^7 Zellen/Transfektion eingesetzt. 30 µg des Plasmids wurden mit Zellsuspension in Zytomix auf 800 µl aufgefüllt und in einer Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 4 mm mit einem *Gene Pulser Xcell* (#165-2660, *Bio-Rad*, München, Deutschland) transfiziert. Für die Elektroporation wurden folgende Einstellungen an dem Gerät vorgenommen: Exponential protocol, 240 V, 1500 µF, ∞ Ohm. Der entstehende Schaum aus denaturierten Proteinen wurde abgesaugt und die Zellsuspension in Medium für 48 h kultiviert. Nach 48 h wurden Experimente durchgeführt.

Für die Transfektion von Hek293 EBNA Zellen wurde FuGENE®HD (#E2311, *Promega*, Mannheim, Deutschland) benutzt. Es wurden 60 µg der DNS-Konstrukte aus Abbildung 21 eingesetzt und damit Zellen auf einzelnen Deckgläser nach Herstellerprotokoll transfiziert. Die Zellen wurden in Medium gehalten bis sie 90 % Konfluenz erreicht hatten und dann wurde zur Selektion 1 µg/ml Puromycin hinzugefügt.

4.2.4 Herstellung von *Membrane Sheets*

Bei der Herstellung von *Membrane Sheets* werden aus intakten Zellen Membranpräparationen ohne den Einsatz von Detergenzien hergestellt. Die Methode und Hintergründe wurden genauer von Lang 2003 beschrieben. Vorteil der Membranpräparation ist die biochemische Zugänglichkeit zur zytosolischen Seite der nativen Plasmamembran, die Begrenzung (vor allem

beim Mikroskopieren) in der Z-Achse und die Reduzierung ausschließlich auf die Membran bzw. daran gebundene Komponenten.

Für die Präparation wurden entweder konstitutiv adhärente Zellen verwendet oder nicht-adhärente Zellen in speziellen Puffern adhären gelassen. Die für die Herstellung von *Membrane Sheets* optimale Konfluenz wurde empirisch bestimmt.

Zur Vorbereitung der Membranpräparation konnten Jurkat E6.1-Zellen 30 min bei 37 °C in Ringerlösung mit $\sim 0,8 \times 10^6$ Zellen/Deckglas adhären. Die Deckgläser mit den adhären Zellen wurden in einem Bad mit eiskaltem *Sheet Puffer* (siehe Kapitel 4.1.2) positioniert und zentral über dem Deckglas mit 5-7 mm Abstand eine Sonotrodenmikrospitze MS 73 (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, Deutschland; 3 mm Spitzendurchmesser) ausgerichtet. Über das an die Sonotroden spitze angeschlossene Ultraschallgerät Sonopuls HD 2070 (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, Deutschland) wurde ein Ultraschallimpuls von 0,1 ms initiiert. Die optimale Impulsstärke war vorher empirisch für jeden Zelltyp bestimmt worden. Erfolgreiche Herstellung von *Membrane Sheets* wurde makroskopisch überprüft und konnte durch einen hellen, ungetrübten, sternförmigen Bereich auf dem mit Zellrasen bedeckten Deckglas erkannt werden. Genauere Bestätigung dessen erfolgte mikroskopisch, mit dem lipophilen Farbstoff TMA-DPH. *Membrane Sheets* wurden sowohl nativ, als auch nach 45-minütiger, 4 %iger PFA-Fixierung verwendet.

4.2.5 Inkubation von *Membrane Sheets* mit Ca^{2+}

Für die Experimente wurden 54 μM Ca^{2+} -Pufferlösungen eingesetzt. Dazu wurde Ca^{2+} -DPTA-Vorratslösung und DPTA-Vorratslösung einer Mischung im Verhältnis 2:3 hergestellt und von dieser Mischung 80 μl in 10 ml K-Glu-Puffer ohne EGTA mit 3 % BSA gegeben und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt (Heinemann *et al.* 1994; Zilly *et al.* 2011).

Deckgläser mit *Membrane Sheets* wurden in 100 µl mit 54 µM Ca^{2+} -Pufferlösungen 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert.

4.2.6 GM1-Färbung mit Cholera toxin B (CTX)

Membrane Sheets wurden dreimal *Sheet Puffer* gewaschen und danach mit 1 µg/ml oder 2 µg/ml Cholera toxin B (CTX)-AlexaFluor®594 (#C-34777, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) 1 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde dreimal für je 5 min mit *Sheet Puffer* gewaschen, fixiert und weitere Färbeschritte in Dunkelheit vollzogen. In wenigen Fällen wurde nach der Fixierung gefärbt, wodurch keinerlei Veränderung der Färbintensität oder sonstiger Eigenschaften auftraten.

4.2.7 Glykolipiddepletion mit GLTP

Für die Glykolipiddepletion wurden Zellen in definierter Dichte (Jurkat E6.1; $2,5 \times 10^6$ Zellen/Deckglas, HepG2; $1,5\text{--}3 \times 10^5$ Zellen/Deckglas am Tag zuvor, PC12; 1×10^6 Zellen/Deckglas am Tag zuvor) auf Deckgläser ausgesät und *Membrane Sheets* daraus hergestellt. Die Deckgläser wurden auf 120 µl Tropfen mit verschiedenen GLTP-Konzentrationen (z. B. 50 µM, wie in Kapitel 4.2.14) in *Sheet Puffer* und unterschiedlich lang (Abbildung 38) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die *Membrane Sheets* dreimal 5 min mit *Sheet Puffer* bei RT gewaschen, mit CTX gefärbt und fixiert (Methode siehe auch Lauria *et al.* 2013).

4.2.8 GM1-Beladung mit GLTP

Für die GM1-Beladung wurden Liposomen mit 5 % (mol/mol) GM1 (monosialotetrahexosyl-ganglioside) (#860065P, *Avanti-Polar Lipids*, Alabaster, USA) und 95 % (mol/mol) DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (#850375C, *Avanti-Polar Lipids*, Alabaster, USA) hergestellt. Dazu wurden die in Chloroform gelösten Lipide unter Stickstoffatmosphäre abgedampft und mit einer finalen Konzentration von

2 mg/ml in *Sheet* Puffer 1 h bei 37 °C schüttelnd resuspendiert. Die Liposomensuspension wurde 10-mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C in einem Wasserbad wieder aufgetaut. Danach wurde die Suspension mindestens 11-mal in einem Mini-Extruder (#610000, *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, USA) durch eine Membran mit 400 nm Poren (#800282, *Whatman*, Maidstone, United Kingdom) gepresst. Die Liposomensuspension wurde bei 4 °C nicht länger als 5 Tage gelagert.

GLTP-WT (und die generierten Mutanten beschrieben in Kapitel 4.2.14) wurde in definierter Konzentration mit der Liposomenkonzentration gemischt und für 20 min bei 37 °C präinkubiert. Im Anschluss wurde ein Tropfen von 120 µl auf einer hydrophilen Oberfläche positioniert und die Deckgläser mit *Membrane Sheets* darauf gelegt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die GLTP-Liposomen-Mischung wurde entfernt und die *Membrane Sheets* für dreimal 5 min mit *Sheet* Puffer gewaschen, mit CTX gefärbt und anschließend fixiert. (Methode siehe auch Lauria *et al.* 2013)

4.2.9 Glykolipidtransfer zwischen nativen Membranen mit GLTP

Jurkat E6.1 *Membrane Sheets* wurden wie in Kapitel 4.2.7 beschrieben mit GLTP glykolipid-depletiert. Die GLTP-Lösung wurde nach Abschluss der Depletion nicht verworfen, sondern vorsichtig von den Deckgläsern abgenommen und ähnlich wie in Kapitel 4.2.8 für die Beladung von HepG2 *Membrane Sheets* benutzt. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurden die HepG2 *Membrane Sheets* dreimal 5 min mit *Sheet* Puffer gewaschen und CTX-gefärbt und fixiert (Methode siehe auch Lauria *et al.* 2013). Auf Grund starker Unterschiede im GM1-Gehalt (74-fach) wurden Jurkat E6.1 bzw. HepG2 *Membrane Sheets* für 100 ms bzw. 1000 ms bei gleicher Anregungsintensität aufgenommen. Unter der Annahme dass die Expositionszeit im linearen Verhältnis zur Intensitätsmessung steht, wurden

die gemessenen Werte der HepG2 *Membrane Sheets* durch den Faktor zehn geteilt und in einem Diagramm aufgetragen.

4.2.10 pH-abhängige Verschiebung des GFP-Anregungsspektrums

Bei Absenkung des pH-Wertes unter 5,0 verändert GFP sein Anregungsspektrum hin zu einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 390 nm (Kneen *et al.* 1998). Deshalb ist bei der Anregung mit einem 488 nm-Laser eine sehr viel geringere Fluoreszenzintensität zu beobachten. Der Vorgang ist reversibel und daher geeignet die Zugänglichkeit und somit Lokalisierung eines GFP-Moleküls zu überprüfen. Bei Absenkung des pH-Werts auf *Membrane Sheets* und Zugänglichkeit des GFP-Proteins sollte die Fluoreszenz reversibel abnehmen. Wenn das GFP in einem abgeschlossenen Kompartiment, wie z. B. dem ER oder den späten Endosomen bzw. Lysosomen (Schulze *et al.* 2009) lokalisiert sein sollte, so würde sich die Fluoreszenz bei einer pH-Wert-Senkung nicht ändern.

Es wurden Fluoreszenzbilder von *Membrane Sheets* in *Sheet Puffer* mit pH 7,4 gemacht, dann gegen *Sheet Puffer* mit pH <5,0 getauscht und erneut Bilder aufgenommen. Die *Membrane Sheets* wurden mit *Sheet Puffer* pH 7,4 gewaschen und bei pH 7,4 nach 5 min erneut Bilder aufgenommen.

4.2.11 Immunfärbungen von *Membrane Sheets*

Membrane Sheets wurden 45 min bei RT mit 4 % [w/v] PFA fixiert und anschließend 20 min mit 50 mM NH₄Cl überschüssiges PFA gebunden. Nach einem 10-minütigen Waschschrift in PBS wurden die *Membrane Sheets* mit dem primären Antikörper in verschiedenen Verdünnungen (α SNAP-25 1:300 siehe Kapitel 4.1.4) in 3 % [w/v] BSA/PBS 1 h bei RT inkubiert. Dreimaliges, 5-minütiges Waschen mit PBS wurde gefolgt von 1 h Inkubation mit sekundärem fluoreszenzgekoppeltem Antikörper (z. B. AlexaFluor® 488 Esel α -Maus IgG) 1:200 in 3 % [w/v] BSA/PBS. Nach

weiteren drei zehnminütigen Waschschritten in PBS wurden die Proben entweder für maximal 24 h bei 4 °C gelagert oder mikroskopiert.

4.2.12 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem „*BCA Protein Assay Reagent*“ (#23225, *Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products*, Rockford, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit einem Infinite® F200pro Mikroplattenlesegerät (*TECAN*, Crailsheim, Deutschland) wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und anhand einer BCA-Standardreihe die Proteinkonzentration ermittelt.

4.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) Coomassie Färbung und Western Blot

Proteinbiochemie wurden nach Standardmethoden durchgeführt, siehe z. B. (Laemmli 1970; Towbin *et al.* 1979; Rehm & Letzel 2010) oder (Kyhse-Andersen 1984). Für die SDS-PAGE wurden 2-30 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Vor dem Auftragen waren die Proben mit ¼ des Endvolumens 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C aufgeköcht worden. Die Gele beinhalten 12 % Acrylamid/0,32 % Bisacrylamid im Trenngel und 4 % Acrylamid/0,11 % Bisacrylamid im Sammelgel. Nach Beladung mit den Proben wurde 30 min eine Spannung von 90 V angelegt und danach weitere 50 min eine Spannung von 120 V.

Proteine wurden für 45 min bei 250 mA (Beschränkung auf 10 V) auf Nitrozellulosemembranen (#10485376, *Whatman*, Maidstone, UK) transferiert. Die Membran wurde 1 h in 5 % [w/v] Milchpulver/TBS blockiert und dann 1 h bei RT mit einem primären Antikörper inkubiert (z. B. αHis 1:1000). Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBST bei RT wurde die Membran 1 h mit sekundären, fluoreszenzgekoppelten Antikörper (z. B. Esel α-Ziege IRDye®800CW, 1:5000) in „*Odyssey® Blockin Buffer*“ (#402-467-0700, *LI-COR*, Bad Homburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde

die Membran dreimal mit TBST und einmal mit TBS für je 5 min gewaschen und die Fluoreszenz in einem „Odyssey® CLx Imaging System“ (LI-COR Inc., Lincoln, USA) detektiert und visualisiert.

4.2.14 Proteinaufreinigungen

Für die durchgeführten Experimente wurden aufgereinigte Proteine benötigt. Diese wurden in zwei verschiedenen Expressionssystemen hergestellt. ICAM1 wurde wegen mehreren extrazellulären Glykosylierungen in eukaryotischen Zellen, genauer Säugetierzellen, exprimiert. GLTP konnte dagegen in Bakterien (*E. coli*) produziert werden.

Proteinaufreinigung von ICAM1 aus einer Zelllinie

ICAM1 war als trunkiertes Protein ohne Transmembrandomäne und intrazellulären Teil, aber mit 8x His-Tag, konzipiert worden (Abbildung 21). Durch Entfernen der Transmembrandomäne wurde das Protein wegen seiner Signalsequenz konstitutiv exozytiert.

Mit ICAM1- Δ TMR-(mEGFP-)Xa-8xHis stabil episomal transfizierte (siehe Kapitel 4.2.3) Hek293EBNA Zellen, wuchsen bis zu einer Konfluenz von 90 % in Selektionsmedium. Zur Ernte des in den Überstand abgegebenen Proteins wurden die Zellen in Selektionsmedium ohne FBS gehalten, alle 3 Tage der Zellüberstand abgenommen, mit final 1 mM PMSF versetzt und bei 4 °C maximal 1 Woche gelagert. Der Zellüberstand wurde maximal dreimal ausgetauscht. Danach wurden die Zellen verworfen.

Das Protein wurde mit Protino® Ni-NTA Agarose (#745400.100, *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Um die Agarose zu äquilibrieren wurde Bindepuffer 1 mit 10 mM Imidazol pH 8,0 hergestellt. In 50 ml dieses Puffers wurden 5 ml Agarose Aufschlämmung (*slurry*) für 10 min äquilibriert. Nach einer Minute Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand verworfen. Das Waschen und Äquilibrieren der Agarose wurde wiederholt. Alle folgenden Schritte wurden mit vorgekühlten Puffern bei 4 °C durchgeführt.

Von dem Zellkulturüberstand (mit exprimiertem ICAM1- Δ TMR-(mEGFP-)Xa-8xHis darin) wurden 200 ml durch einen Rotilab Faltenfilter Typ 113 P (#CA07.1, *Carlroth*, Karlsruhe, Deutschland) gefiltert, um Zelldebris und andere Verschmutzungen abzutrennen. Danach wurden 22 ml 10 x Binde-/Waschpuffer 1 pH 8,0 und 1 ml 2 M Imidazolösung (final 10 mM) hinzu gegeben. Die äquilibrierte Agarose wurde zu dem Zellkulturüberstand gegeben und beides bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach der Bindung der Proteine an die Agarose folgten mehrere Waschschrte. Dazu wurde das Zellkulturüberstand-Agarose-Gemisch auf Säulen mit inerter Fritte (#737-4251 und # 731-0003, *Bio-Rad*, München, Deutschland) und einem Durchmesser von 2,5 cm gegeben und nach 10 min der Durchfluss verworfen. Zwei Waschschrte mit je 100 ml Binde-/Waschpuffer 1 / 20 mM Imidazol folgten, bei denen die Agarose erst aufgewirbelt wurde und sich dann 10 min absetzen konnte, bevor der Durchfluss verworfen wurde. Um das Protein zu eluieren wurde die Agarose mit 10 ml Binde-/Waschpuffer 1 / 200 mM Imidazol durchmischt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Der Durchfluss wurde als Eluat gesammelt.

Die Agarose wurde mit 100 ml 30 % EtOH absolut. gewaschen und in 10 ml 30%igem EtOH absolut. bei 4 °C bis zur erneuten Nutzung gelagert (Wiederverwendung nur mit identischem Protein).

ICAM1- Δ TMR-(mEGFP-)Xa-8xHis wurde entweder erst mit PD10-Säulen (#17-0851-01, *GE Healthcare*, Freiburg, Deutschland) oder direkt mit *Amicon Ultra-10 Millipore* Filtern (#UFC901024, *Merck-Millipore*, Darmstadt, Deutschland) umgepuffert. Beim Umpuffern mit den PD10-Säulen wurden diese 5-mal mit 5 ml HBS* äquilibriert, 2,5 ml des Eluats aufgetragen und mit 3,5 ml HBS* nachgespült. Es wurden 3,5 ml umgepuffertes Eluat aufgefangen. Danach wurde die PD10-Säule mit 25 ml HBS* äquilibriert und der Vorgang viermal wiederholt bis kein Ursprungseluat mehr vorhanden war. Das umgepufferte Protein wurde mit *Amicon Ultra-10 Millipore* Filtern konzentriert und 10 % Glycerol hinzugefügt.

Da diese Art des Umpufferns sehr langwierig war, wurde in anderen Versuchen mit den *Amicon Ultra-10 Millipore* Filtern gleichzeitig sowohl umgepuffert als auch aufkonzentriert. Dazu wurde das Eluat mit HBS*/10 % [v/v] Glycerol auf 12 ml aufgefüllt und dann 23 min bei 5000 x g zentrifugiert, um ein finales Volumen von 0,5 ml zu erreichen. Der Durchfluss wurde verworfen und weitere viermal gewaschen. Am Schluss sollte durch die Verdünnung eine Imidazolkonzentration von nur ~0,6 nM erreicht worden sein. Die Proteinkonzentration in HBS*/10 % Glycerol wurde per BCA-Test gemessen und auf 100 nM eingestellt (Nye & Groves 2008). Das bedeutete für ICAM1-ΔTMR-Xa-8xHis 90 µg/ml und für ICAM1-ΔTMR-mEGFP-Xa-8xHis 110 µg/ml. Es wurden 100 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Proteinaufreinigung von GLTP aus Bakterien

Die in Abbildung 22 beschriebenen Plasmide wurden in kompetente *E. coli* BL21(DE3) pLys (#P9811, *Promega*, Mannheim, Deutschland) transformiert. Die Bakterien wurden aus vereinzelteten Klonen in 50 ml LB_{Amp/Cam} (Ampicillin 500 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml) Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit der Vorkultur wurde eine 2 l-Hauptkultur mit einer OD von 0,1 angeimpft und ~3 h bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 wachsen gelassen. Dann wurde mit 10 mM IPTG (4,7 g / 2 l) (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) induziert und 6 h bei 24 °C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min bei 5000 x g 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit 30 ml kaltem 10 mM Tris-Puffer pH 8 gewaschen. Die folgenden Schritte wurden mit gekühlten Puffern bei 4 °C vollzogen. 40 ml Lysis-/Bindepuffer 2 wurde auf das Pellet gegeben, die Bakterien darin resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde die Bakteriensuspension in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und dieses in einem Eisbad positioniert. Die Sonotrodenmikrospitze MS 73 (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, Deutschland; 3 mm Spitzendurchmesser) des Ultraschallgeräts Sonopuls HD 2070 (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin,

Deutschland) wurde in das obere Drittel der Suspension eingetaucht ohne dass der Rand des Gefäßes berührt wurde. Daraufhin wurde erst 1 min lang ein konstanter Impuls von 40 % Intensität und anschließend 10 min unterbrochene Impulse von 3×10 % mit einer Intensität von 40 % angewendet. Wenn sich das Bakterienlysate nicht geklärt hatte, wurde zwei weitere Male für 10 min mit Intervallen wie zuvor sonifiziert. Das Lysat wurde in 2 ml Reaktionsgefäße umgefüllt und bei $20.000 \times g$ 4 °C für 30 min zentrifugiert. Währenddessen wurden 3 ml Protino® Ni-NTA Agarose (#745400.100, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) Aufschlammung (*slurry*) in 50 ml Wasch-/Elutionspuffer 2 mit 20 mM Imidazol äquilibriert. Die äquilibrierte Agarose wurde mit dem Überstand des Lysats über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert.

Die Agarose mit gebundenem Protein (GLTP1 bzw. Mutanten dessen) wurde auf Säulen mit inerter Fritte (#737-4251 und # 731-0003, Bio-Rad, München, Deutschland) und einem Durchmesser von 2,5 cm gegeben. Nach Absetzen der Agarose wurde der Durchfluss verworfen. Es folgten ein Waschschrift mit 35 ml Wasch-/Elutionspuffer 2 mit 20 mM Imidazol, ein Weiterer mit 25 ml Wasch-/Elutionspuffer 2 mit 50 mM Imidazol und ein Letzter mit 25 ml Wasch-/Elutionspuffer 2 mit 70 mM Imidazol. Die Elution erfolgte in 15 ml Wasch-/Elutionspuffer 2 mit 300 mM Imidazol. Das Eluat wurde auf einen Amicon Ultra-10 Millipore Filter (#UFC901024, Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) gegeben und viermal je ~1 h bei 4 °C und $5000 \times g$ mit PBS/ 10 % Glycerol umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde per BCA-Test bestimmt, eine Konzentration von 100 µM eingestellt, Aliquots à 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

$(M [\text{GLTP}] = 23,85 \text{ kDa} \rightarrow \{ c [\mu\text{M}] = p [\mu\text{g}/\mu\text{l}] / 0,02385 [\text{g/mol}] \})$

4.2.15 Erstellung einer *Supported Lipid Bilayer* (SLB)

Supported Lipid Bilayers können durch die Fusion von Vesikeln/Liposomen auf hydrophilen Substraten (z. B. Deckgläser) hergestellt werden (McConnell

et al. 1986). In dieser Arbeit wurde hierzu ein verändertes Protokoll von Vardhana und Dustin 2008 genutzt.

Lipide wurden im Stoffmengenverhältnis 99 % 18:1 (Δ^9 -Cis) DOPC (#850375C, *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, USA), 0,98 % DGS-NTA(Ni) (#790404C, *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, USA) und 0,02 % 18:1 Biotinyl CAP-PE (#870273C, *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, USA) gemischt (Nye & Groves 2008; Yu et al. 2010). Dazu wurden die in Chloroform gelösten Lipide unter einem Abzug gemischt und dampften 40 min unter einem Stickstoffstrom ab. Anschließend wurden die Lipide in HBS* mit einer Konzentration von 2 mg/ml aufgenommen, für 1 min gevortext und dann 21-mal mit einem Mini-Extruder (#610000, *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, USA) durch Membranen mit 100 nm Poren (#610005, *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, USA) gepresst (Nye & Groves 2008). Die vorher milchige Suspension hatte sich nach dem Extrudieren geklärt und es waren unilamellare Liposomen, auch als SUVs (*small unilamellar vesicles*) bezeichnet, entstanden. Die Liposomen wurden maximal 5 Tage bei 4 °C gelagert.

Die *Supported Lipid Bilayer* wurde innerhalb einer Perfusionskammer (FCS2 Starter Set, #060319-2, Biopetechs, Butler, USA) erstellt. Das Mikroaquädukt und die Dichtung des Perfusionsraumes (Abbildung 23) wurden 30 min mit 1 % (w/v) BSA/HBS* inkubiert und danach getrocknet. Dann wurde auf das hydroxylierte Deckgläser (siehe Kapitel 4.2.2) ein Tropfen von 1-20 μ l Liposomensuspension gegeben und dann die Kammer wie in Abbildung 23 zusammen gebaut. Die Position des Tropfens wurde auf dem Mikroaquädukt mit einem Stift markiert und nach 30 min Inkubation bei RT die Kammer mit 5 ml HBS* gewaschen. Luftblasen waren zu vermeiden, da sie die Lipidschicht zerstören.

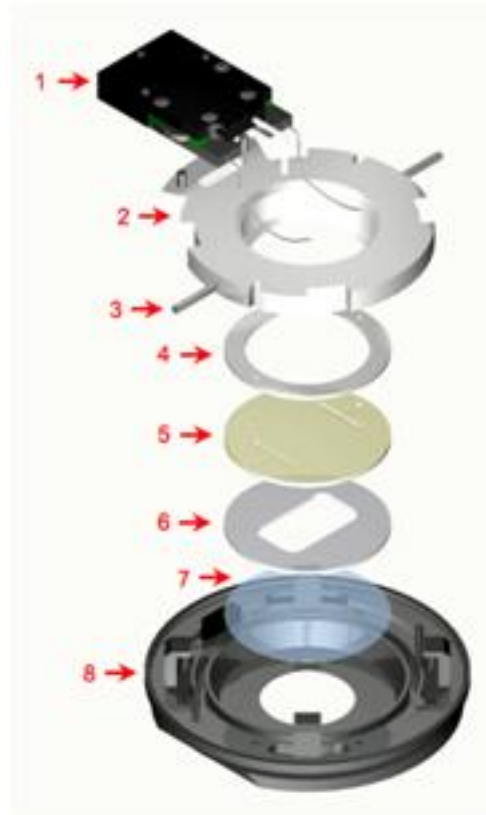


Abbildung 23 Bestandteile der Perfusionskammer (Biotech FCS2)

Der Zusammenbau der Kammer erfolgte invertiert. (1; optionle Heizelemente, 2; oberer Rahmen, 3; Perfusionsröhre, 4; obere Dichtung, 5; Mikroaquädukt, 6; Dichtung des Perfusionsraumes, 7; hydroxyliertes 40 mm Deckglas, 8; verschließbares unteres Rahmenelement) (<http://www.biotech.com/Products/FCS2/fcs2.html>; 25.03.2013)

Aktivierung von Jurkat E6.1 auf einer SLB

Nachdem sich die *Supported Lipid Bilayer* ausgebildet hatte, wurde die Integrität der Membran mit dem lipophilen Farbstoff TMA-DPH am Mikroskop überprüft. Die Perfusionskammer wurde mit 5 ml 1 % [w/v] BSA/HBS* (Kapitel 4.1.2) durchspült und 10 min inkubiert, um adhäsive Flächen mit Protein absättigen. Anschließend wurde die Membran mit 2 µg/ml Streptavidin (1:500)(# S4762, *Sigma-Aldrich*, Hamburg, Deutschland oder Streptavidin AlexaFluor®594, #S-32356, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) in HBS* 20 min inkubiert (Shen *et al.* 2009). Danach wurde mit 5 ml HBS* gewaschen und für weitere 20 min mit 100 µl 100 nM ICAM1-ΔTMR-

(mEGFP-)Xa-8xHis (siehe Kapitel 4.2.14) und 5 µg/ml biotinyliertem αTCR inkubiert (Okt3, #13-0037-80, *eBioscience (NatuTec)*, Frankfurt, Deutschland oder Hit3a, #300303, *Biolegend*, Fell, Deutschland). Nach einem weiteren Waschschrift mit 5 ml HBS* wurde die Perfusionskammer auf dem Mikroskop befestigt, die Heizelemente angeschlossen, der Perfusionsraum auf 37 °C geheizt und die Integrität der Membran per TMA-DPH überprüft. Danach wurden 3×10^6 Zellen/ml Jurkat E6.1 in HBS* oder Ringerlösung auf die SLB gegeben und über die Zeit beobachtet.

Herstellung von *Membrane Sheets* auf einer SLB

Nachdem die Jurkat E6.1-Zellen auf der SLB adhärirt waren, konnte die Kammer unter Ausschluss von Luft in einem Becherglas, gefüllt mit *Sheet* Puffer, sehr vorsichtig geöffnet und das Mikroaquädukt mit Perfusionskammerdichtung und Deckglas vom Rahmen separiert werden. Mit einer Pinzette wurde das Deckglas mit Perfusionskammerdichtung vorsichtig vom Mikroaquädukt getrennt und wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben unter der Sonotrode positioniert. Nach Applizieren des Ultraschallimpulses wurde unter Luftabschluss das Mikroaquädukt wieder mit Dichtung, Deckglas und Rahmenteil verbunden und die Perfusionskammer wieder verschlossen. Bei Anschluss der Perfusionsschläuche musste darauf geachtet werden, keine Luftblasen in die Kammer einzubringen.

4.2.16 Mikroskopie

Epifluoreszenzmikroskopie

Für die Epifluoreszenzmikroskopie wurden die Mikroskope Olympus IX81 und Zeiss Axio Observer D1 (siehe Kapitel 4.1.1) genutzt. Hauptsächlich wurden *Membrane Sheets* (Kapitel 4.2.4) mikroskopiert und die Integrität der Membranen durch TMA-DPH, im Verhältnis 1:3 mit dem verwendeten Puffer gemischt, überprüft. Bei PFA-fixierten Zellen oder *Membrane Sheets* wurde

PBS, bei nativen *Membrane Sheets* der *Sheet* Puffer und bei ganzen Zellen Ringerlösung verwendet.

Für die Kolokalisierungs- und Clustergradanalyse (Kapitel 4.2.17) wurde das Olympus IX81 Mikroskop mit einer 192-fachen Vergrößerung und daraus resultierender Pixelgröße von 83 nm/px eingesetzt.

Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF)-Mikroskopie

Bei der TIRFM wird mit einem speziell eingekoppelten Laser ein auf wenige 100 nm in Z-Achse beschränktes Anregungsfeld erzeugt. Dadurch ist es möglich an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Wasser eine optische Schnittfläche zu erzeugen. Die in dieser Schnittfläche angeregten Moleküle stammen, z. B. bei adhären Zellen, fast ausschließlich aus der Plasmamembran und daran gedockten Vesikeln. Dadurch können membranständige, fluoreszenzmarkierte Proteine mit einem guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis beobachtet werden, da Fluoreszenz außerhalb des Fokus nahezu nicht angeregt wird.

Für die TIRF-Aufnahmen wurde das Olympus IX81 und der eingekoppelte 488 nm-Laser verwendet. Der TIRF-Winkel wurde empirisch bestimmt. Zellen, die zwei Tage zuvor transfiziert worden waren, wurden in Ringerlösung mikroskopiert.

Konfokale Mikroskopie

Für die konfokale Mikroskopie wurde ein Olympus FluoViewTM FV1000 benutzt (siehe Material 4.1.1). Die Bilder wurden mit einer Pixelgröße von 207 nm und einer Verweildauer von 40 μ s/px aufgenommen. Es wurden für den 488 nm Laser Intensitäten von 0,2–2,0 % und für den 543 nm Laser Intensitäten zwischen 2 % und 8 % zur Anregung der Fluorophore benutzt. Bei Erstellung von 3D-Stapeln wurden Abstände zwischen 370 nm und 410 nm zwischen den einzelnen Bildebenen gewählt.

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) mit Berechnung von Diffusionskoeffizienten

Für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten der SLB wurden FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)-Messungen durchgeführt. Die SLB wurde wie in Kapitel 4.2.15 erstellt und 10 min mit den Proteinen inkubiert, so wie in Nye und Groves 2008 beschrieben. Es wurde das konfokale Mikroskop FluoView™ FV1000 benutzt und Aufnahmezeiten von 100-140 s bei 1 Hz Aufnahmegeschwindigkeit gewählt. Die Intensitäten der anregenden Laser betrugen 0,2 % oder 0,3 % für den 488 nm-Laser und 4 % oder 6 % für den 543 nm-Laser. Die Pixel der Bilder hatten eine Größe von 414 nm und wurden mit einer Verweildauer von 20 µs/px aufgenommen. Als FRAP-Region wurde ein Areal von 20 x 20 px (68,56 µm²) gewählt und nach 3 vorhergehenden Aufnahmen für 500 ms mit voller Intensität der Laser gebleicht. Danach wurden weitere 97-137 Bilder aufgenommen.

Für die weitere Analyse wurde zusätzlich zur FRAP-Region noch eine gleichgroße zweite Region ausgewählt und die Intensitäten in Beiden über die Zeit gemessen. Wenn die Kontrollregion mehr als 15 % Fluoreszenzabweichung nach Ende des Bleichvorgangs aufwies, wurde die gesamte Messung verworfen. Dies wurde als ein Hinweis für einen Fokusdrift oder ein zu großes Bleichfeld-zu-Membran-Verhältnis gewertet.

Die gemessenen Werte wurden in *OriginPro 8G* mit Hilfe der Hyperbola-Formel aus (Ficz 2005) gefittet.

$$y(t) = y_0 + \text{Rec}_{\text{Max}} \times t / (T_{1/2} + t)$$

Mit $T_{1/2}$ als der Halbwertszeit, y_0 als Ordinatenabschnitt und Rec_{Max} als dem maximalen Wert des zurückkehrenden Fluoreszenzsignals. Die so ermittelte Halbwertszeit und der bekannte Radius der Bleichregion (4,14 µm) wurden zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten genutzt.

$$D = (w^2 / 4 T_{1/2}) \gamma_D \quad (\text{Axelrod et al. 1976})$$

Mit w als Radius der Bleichregion, $T_{1/2}$ als Halbwertszeit und γ_D als Korrekturfaktor (in diesem Fall 1,0 Ficz 2005).

Für die Darstellung der Diffusionsuntersuchung von *Supported Lipid Bilayers* wurden aus unabhängigen Experimenten die Messungen pro Experiment ($n = 5-10$) gemittelt. Die Fluoreszenzdaten der Experimente ($n = 3-4$) wurden wiederum gemittelt und daraus Graphen erstellt (Abbildung 28 A und B mit SEM als Fehlerbalken), bzw. pro Experimenttag die Halbwertszeit und der Diffusionskoeffizient berechnet. Aus den Diffusionskoeffizienten der einzelnen Tage wurde der durchschnittliche Diffusionskoeffizient mit SEM berechnet (Abbildung 28C).

4.2.17 Analysemethoden von Mikroskopiebildern

Die Auswertungen der Mikroskopiebilder, insbesondere die Auswertung von *Membrane Sheet*-Bildern, wurde mit der Bildanalysesoftware *ImageJ* (Schneider *et al.* 2012) durchgeführt. Es wurden Bilder im DAPI-Kanal, in dem der Lipidfarbstoff TMA-DPH aufgenommen wird, benutzt, um unbeeinflusste ROIs (*Region Of Interest*) (Messareale) im Bereich des *Membrane Sheets* bzw. der Zelle zu legen. Zusätzliche ROIs wurden auch im Bereich des Hintergrundes gelegt. Die Verschiebung der Bilder einzelner Kanäle wurde falls nötig mit fluoreszierenden Referenzkugeln korrigiert (obligatorisch in Kolokalisierungsstudien). Danach wurden die gewählten ROIs verwendet, um Messungen in allen aufgenommenen Kanälen durchzuführen. Mit dem Befehl „*Analyze - > Measure*“ wurden Daten der ROI wie Fläche, Höhe, Breite, Position, Durchschnitt der Messwerte und Standardabweichung der Messwerte registriert. Die Auswertung dieser Daten erfolgte in *Microsoft Excel*.

Quantitative Analyse von Fluoreszenzintensitäten

Nur Aufnahmen mit gleicher Expositionszeit, Vergrößerung, Anregungsintensität, aufgenommen mit identischen optischen Instrumenten,

wurden für quantitativ vergleichende Analysen verwendet. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden Durchschnittswerte der Fluoreszenzintensitäten in ROIs innerhalb und außerhalb von Zellen und *Membrane Sheets* gemessen. Von den in *Membrane Sheets* bzw. Zellen ermittelten Werten wurden die, in unmittelbarer Nähe gemessenen, Werte des Hintergrunds abgezogen und somit die hintergrundkorrigierte Nettofluoreszenzintensität des/der *Membrane Sheets*/Zelle ermittelt.

Clustergradanalyse

Eine Methode die Verteilung von Proteinen in Clustern zu quantifizieren ist die Einbeziehung der relativen Standardabweichung (SD_{ROI}) eines gemessenen Bereichs (ROI) von fluoreszenzmarkierten Proteinen (z. B. Abbildung 20). Die Standardabweichung ist ein Ausdruck für die Schwankung der gemessenen Werte um den Mittelwert. Wenn ein Messbereich sehr uniform ist, ist auch die Standardabweichung klein. Gibt es große Intensitätsunterschiede, z. B. hervorgerufen durch Proteincluster, so ist die Standardabweichung höher. Bei unterschiedlichen Intensitäten der Messareale (ROIs) kann es vorkommen, dass Areale mit höheren Intensitäten stärker gewichtet werden als dunklere. Um dies zu vermeiden und die Färbe- und Expressionsunterschiede von Proteinen auszugleichen, wurde die jeweilige Standardabweichung der ROIs durch die mittlere, hintergrundkorrigierte Intensität (I_{ROI}) dieser dividiert. Der relative Grad des Proteinclusters ($SD/mean$) wurde nach folgender Formel berechnet (Zilly *et al.* 2011; Schreiber *et al.* 2012):

$$SD/mean = SD_{ROI} / I_{ROI}$$

Für die Clustergradanalyse wurden Aufnahmen mit einer Pixelgröße von 83 nm am Olympus IX81 Mikroskop gemacht. Die *Membrane Sheets* waren aus transfizierten Jurkat E6.1-Zellen hergestellt und fixiert worden. Die Membran wurde mit TMA-DPH sichtbar gemacht und Bilder im DAPI- und GFP-Kanal aufgenommen. Die Aufnahme der Lipidfärbung (TMA-DPH)

wurde benutzt, um ROIs innerhalb der intakten *Membrane Sheets* zu legen. Die eigentliche Messung der Standardabweichung und Fluoreszenzintensität fand in den gewählten ROIs im GFP-Kanal statt.

Kolokalisierungsanalyse

Kolokalisierungsanalysen von rot und grün fluoreszenzmarkierten Proteinen wurden per Pearsons Korrelation, wie von Manders *et al.* 1992 beschrieben (Manders *et al.* 1992), durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient wird nach folgender Formel berechnet:

$$r = \sum_i (R_i - R_{av}) \times (G_i - G_{av}) / \{ \sum_i (R_i - R_{av})^2 \times \sum_i (G_i - G_{av})^2 \}^{1/2}$$

Dabei stehen R_i und G_i für die Intensitäten der roten und grünen Pixel i (bzw. Voxel), und R_{av} und G_{av} als Durchschnittswerte von R_i und G_i (Manders *et al.* 1992). Der Korrelationskoeffizient setzt die lineare Beziehung zweier Verteilungen in ein Verhältnis, in diesem Fall die Fluoreszenzintensitätsverteilungen von zwei Bildern. Dabei variieren die Werte zwischen $r = 1,0$, als exakte Kopie zweier Bilder und damit ihrer Intensitätswerte, und $r = -1,0$, als inverses Bild. Bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0$ besteht kein Zusammenhang zwischen den Intensitätsverteilungen. Aufgrund von experimentellen und biologischen Faktoren wird ein Wert von 1,0 meist nicht erreicht und schon ein Wert ab $r = 0,5$ kann als starke Kolokalisierung zweier Proteine angesehen werden (Sieber *et al.* 2006).

In den Experimenten wurden Jurkat E6.1-Zellen mit zwei unterschiedlich fluoreszenzgekoppelten Proteinen transfiziert (mEGFP und mRFP) und *Membrane Sheets* hergestellt. Die *Membrane Sheets* wurden mit TMA-DPH nach Fixierung gefärbt und zusammen mit multifluoreszenten 100 nm Partikeln (*TetraSpeckTM microspheres*, #T-7279, *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland) im DAPI-, GFP-, und RFP-Kanal aufgenommen. Die Aufnahmen wurden zum Ausgleich der chromatischen Aberration und

anderer Faktoren im Programm ImageJ mit dem Plugin „Align_Slice“ (G. Landini; <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>, 28.03.13) pixelgenau ausgerichtet. Im Anschluss wurden im TMA-DPH Bild innerhalb der *Membrane Sheets* eine ROI gelegt. Diese ROI wurde zur Analyse der korrespondierenden roten (R_i) und grünen (G_i) Pixelintensitäten der Bilder genutzt. Hierfür wurde das ImageJ Plugin „Colocalization Indices“ (Nakamura *et al.* 2007) (<http://www.mbs.med.kyoto-u.ac.jp/imagej/>; 28.03.13) verwendet.

Um zu Überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Expressionsstärken der kolokalisierten Proteine und dem Korrelationskoeffizienten bestand, wurden gemessene, hintergrundkorrigierte Intensitäten der ROIs durch die Expositionszeit des Bildes geteilt. Die „Intensität einer ROI pro Sekunde“ wurde für beide Kanäle gegen den Wert des Korrelationskoeffizienten aufgetragen. Schwellenwerte wurden definiert und Werte jenseits dieser verworfen. Aus den restlichen Korrelationskoeffizienten wurden pro Tag Mittelwerte berechnet. Die Mittelwerte pro Tag wurden wiederum gemittelt und mit dem SEM angegeben.

Verteilungsanalyse von Intensitäten in einer *Membrane Sheets*-Population

Membrane Sheets waren wie in Kapitel 4.2.7 behandelt, gefärbt und fixiert worden. An jedem Tag und für jede experimentelle Bedingung wurden 10 Bilder (100 ms Cy3-Kanal, 266 nm/px, 512 x 512 px) aufgenommen. Zusätzlich wurden Aufnahmen im DAPI-Kanal gemacht, um die mit TMA-DPH gefärbten *Membrane Sheets* zu visualisieren. In der Aufnahme des Lipidfarbstoffs wurde pro *Membrane Sheet* eine ROI innerhalb und eine identischer Größe im Hintergrund gesetzt. Die hintergrundkorrigierten Werte der Kontrollbedingungen wurden gemittelt und als Referenzwert des

jeweiligen Experimenttages definiert. Gemessene Intensitäten der anderen Bedingungen wurden auf diesen Referenzwert normiert.

Für die bessere Darstellung der normierten Werte wurden Intervalle in Schritten von 0,1 (-0,45 bis 6,45) gesetzt und die Anzahl der ROIs (*Membrane Sheets*) pro Intervall ermittelt. Der prozentuale Anteil dieser an der Gesamtzahl der *Membrane Sheets*, pro experimenteller Bedingung und Experimenttag, wurde berechnet. Aus der Anzahl der „*Membrane Sheets* pro Intervall und Tag“ wurde jeweils ein Mittelwert mit SEM aller Experimenttage berechnet. Diese Mittelwerte wurden in ein Histogramm mit der „prozentualen Häufigkeit von *Membrane Sheets* pro Intervall“ als Ordinate und den Intervallen der „vielfachen Intensität der Referenzwerte“ als Abszisse aufgetragen, siehe Abbildung 39.

Streudiagramm (*scatter plot*)

Ein Streudiagramm wurde z. B. für Abbildung 42 erstellt. Dabei wurden die hintergrundbereinigten Fluoreszenzintensitäten einzelner ROIs gegen den korrespondierenden Clustergrad als SD/mean in ein XY-Koordinatensystem aufgetragen. Die Messungen aller Kontroll-ROIs der Experimenttage wurden gesammelt in einem Diagramm aufgetragen.

5 Ergebnisse

Um die physikochemischen und biochemischen Einflüsse der Plasmamembran auf das Clusterverhalten des T-Zell-Rezeptors zu untersuchen, wurden zunächst in der Literatur beschriebene Testsysteme etabliert, die es erlauben den Clusterzustand des TCR zu untersuchen.

Als erstes wurde ein Marker für den TCR ausgewählt. Als solcher wurde CD3 ζ genutzt, da es in der Plasmamembran konstitutiv im TCR enthalten ist und häufig in der Literatur zur Untersuchung des TCR-Clusters verwendet wurde (Krummel *et al.* 2000; Zal *et al.* 2002; Bunnell *et al.* 2002; Yokosuka *et al.* 2005; Lillemeier *et al.* 2010). Es wurden daher fluoreszierende CD3 ζ -Chimären generiert. Mit diesen wurde dem TCR-Clustergrad in aktiviertem und nicht-aktiviertem Zustand auf immobilisierten Oberflächen gefolgt, um die Reproduzierbarkeit der bekannten Clustercharakteristika zu überprüfen. Anschließend wurde eine mobile (mit diffundierenden Komponenten) aktivierende Oberfläche durch die Erstellung einer SLB geschaffen und die Fähigkeit zur Ausbildung einer IS überprüft (siehe Kapitel 5.1).

Die Primärstruktur von CD3 ζ wurde als Leitfaden für die systematischen Untersuchungen genutzt. Erst wurden der intrazelluläre (Kapitel 5.2), dann der transmembran (Kapitel 5.3) und schließlich der extrazelluläre Bereich (Kapitel 5.4) von CD3 ζ auf die Bedeutung hinsichtlich des TCR-Clusters untersucht.

In Kapitel 5.2 wurde dazu die Rolle der intrazellulären, signalvermittelnden Domänen (ITAM-Domänen) beim TCR-Cluster erforscht. Es wurden CD3 ζ -ITAM-Deletionsmutanten generiert, deren Clusterfähigkeit überprüft, und durch Veränderung der Ca²⁺-Konzentration in diesem Zusammenhang auch die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen analysiert.

Nachdem die intrazellulären Komponenten des TCR untersucht worden waren, wurde die Bedeutung der Membrenumgebung getestet. Dazu wurde

das lipidtransferierende Protein GLTP als Werkzeug benutzt, um die Glykolipidlevel in nativen Plasmamembranpräparationen zu verringern und so Rückschlüsse auf glykolipid-bedingtes TCR-Clustern ziehen zu können (Kapitel 5.3).

Als letzter Teil der Untersuchungen wurde die Relevanz der extrazellulären CD3 ζ -Domäne hinsichtlich des TCR-Clusterzustandes getestet. Erneut wurden CD3 ζ -Mutanten generiert, deren extrazellulärer Teil deletiert war (Kapitel 5.4).

5.1 Clusterverhalten des TCR in unterschiedlichen Aktivierungszuständen

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) mit dem konstitutiv darin enthaltenem CD3 ζ verändert bei Bindung an ein antigenisches Signal sein Clusterverhalten (siehe Kapitel 2.2.4). Aus den, in inaktiven T-Zellen vorliegenden, TCR-Nanoclustern (Schamel *et al.* 2006) entwickeln sich im Laufe der T-Zell-Aktivierung TCR-Mikrocluster (Yokosuka *et al.* 2005), deren Aggregation in der Ausbildung eines cSMAC (*central Supramolecular Activation Cluster*) resultieren kann (Monks *et al.* 1998). Dieser Prozess und das weitere Verhalten der TCR-Cluster können in nicht-aktivierten T-Zellen oder während der T-Zell-Aktivierung je nach Oberfläche oder antigenischem Signal variieren. Es können z. B. immobile Mikrocluster (Bunnell *et al.* 2002), klassische Immunologische Synapsen mit cSMAC (Grakoui *et al.* 1999) oder multifokale Synapsen (Brossard *et al.* 2005) auftreten.

Um später den Einfluss von weiteren Faktoren auf TCR-Cluster abschätzen zu können (siehe Kapitel 5.2 ff.), wurde zunächst das generelle Clusterverhalten des TCR mit GFP-markiertem CD3 ζ in verschiedenen Aktivierungsstadien und auf unterschiedlichen Oberflächen charakterisiert.

5.1.1 TCR-Cluster in nicht-aktivierten und aktivierten T-Zellen auf immobilten Oberflächen

Es wurde untersucht, wie sich der TCR, repräsentiert durch CD3 ζ -mEGFP, auf immobilten Oberflächen in der Plasmamembran verteilt und welche Strukturen er ausbildet. Dazu wurden Jurkat E6.1-Zellen mit CD3 ζ -mEGFP-Plasmiden transfiziert, auf Deckgläser gegeben (siehe Methoden 4.2.3 ff.) und *Membrane Sheets* hergestellt. Die fixierten Proben wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet und dokumentiert. In dem linken Bereich der Abbildung 24A sieht man die Lipidfärbung durch TMA-DPH (DAPI-Kanal), sowie daneben das Fluoreszenzsignal des CD3 ζ -WT-mEGFP im *Membrane Sheet*. Die Lipidfärbung diente als Nachweis für die Integrität der

Plasmamembran. Man sieht, dass die Membranen durchgängig sind und erkennt im äußeren Bereich übereinander liegende Membranstücke als hellere Strukturen. Innerhalb der *Membrane Sheets* sind kleine runde Strukturen zu erkennen, die wahrscheinlich von Einstülpungen oder anderen tubulären oder vesikulären Organellen abstammen.

Die Zelle des linken Teils der Abbildung 24A wurde auf einem nicht-aktivierenden, die Zelle der rechten Teils auf einem aktivierenden Deckglas (siehe Methoden 4.2.2) inkubiert. Das aktivierende Deckglas war mit einem Antikörper gegen Teile des TCR (in dem Fall Okt3) dekoriert worden, der den TCR quervernetzt und dadurch eine künstliche T-Zell-Aktivierung induziert. In dieser experimentellen Konfiguration übernimmt das Deckglas die Rolle der Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit der die T-Zelle einen Kontakt ausbildet. Die Zellen beider Spalten adhärten in Ringerlösung bei 37 °C 30 min. Der TCR (CD3 ζ -WT-mEGFP) ist in der Plasmamembran der nicht-aktivierten Kontrollzelle (Abbildung 24A, linker Teil) nicht uniform verteilt sondern bildete kleine Cluster aus, die sogenannten Nanocluster (Schamel & Alarcón 2013)(genauer siehe Kapitel 2.2.4), die das typische Erscheinungsbild des TCR in nicht-aktivierten Jurkat E6.1-Zellen darstellen. Der TCR zeigte hingegen in aktivierten Jurkat E6.1-Zellen größere Clusterverbände, die durch den Zusammenschluss der Nanoclustern entstanden waren und sich zur Mitte der adhären Plasmamembran der ursprünglichen Zelle hin orientiert hatten (rechter Teil der Abbildung 24A, rechtes Bild). Damit zeigte das verwendete GFP-markierte Wildtypkonstrukt von CD3 ζ die gleichen morphologischen TCR-Strukturen, wie z. B. von Krummel *et al.* 2000 oder Bunnell *et al.* 2002 beschrieben.

Es wurde weiterhin überprüft, ob durch antikörper-induzierte T-Zell-Aktivierung (Okt3) das typische intrazelluläre Signalverhalten angesprochen wurde wie von Samelson *et al.* 1986 und June *et al.* 1990 beschrieben (siehe Kapitel 2.2.3). Wie in Yudushkin und Vale beschrieben, resultierte antikörper-

induzierte T-Zell-Aktivierung in CD3 ζ -Phosphorylierung und daher in der Assoziation des TCR mit der, an phosphorylierte ITAM-Motive bindenden, tandem-SH2-Domäne der ZAP70-Kinase des Reporters mCherry-tSH2(ZAP70) (Yudushkin & Vale 2010). Um zu testen, ob dieser Prozess auch in diesem System nachvollziehbar war, wurden Jurkat E6.1-Zellen sowohl mit CD3 ζ -WT-mEGFP wie auch mit mCherry-tSH2(ZAP70) (siehe Methoden 4.2.1) transfiziert. Die Zellen zeigten bei konfokaler Mikroskopie, wie auch schon in der Epifluoreszenz (Abbildung 24A), CD3 ζ -WT-mEGFP-Cluster, die zentripetal ausgerichtet waren. Die, aus konfokalen Aufnahmen rekonstruierte, Seitenansicht ließ erkennen, dass der TCR hauptsächlich in der basalen Plasmamembran angereichert war. Das mCherry-tSH2(ZAP70) zeigte ein identisches Bild wie der TCR (CD3 ζ -WT-mEGFP) was auf eine Assoziation der Moleküle hindeutete und damit die intrazelluläre CD3 ζ -Phosphorylierungen nachwies (Abbildung 24B, rechte Spalte).

Bei nicht-aktivierten Zellen lag CD3 ζ -WT-mEGFP hingegen verteilt über die gesamte Plasmamembran der Zelle vor und zeigte keine Polarisierung hin zur Adhäsionsfläche. Auch in intrazellulären Kompartimenten war viel CD3 ζ enthalten. Der mCherry-tSH2(ZAP70)-Reporter lag, wie aufgrund der fehlenden Phosphorylierungen zu erwarten gewesen war, diffus verteilt im Zytosol der Zellen vor (Abbildung 24B, linke Spalte).

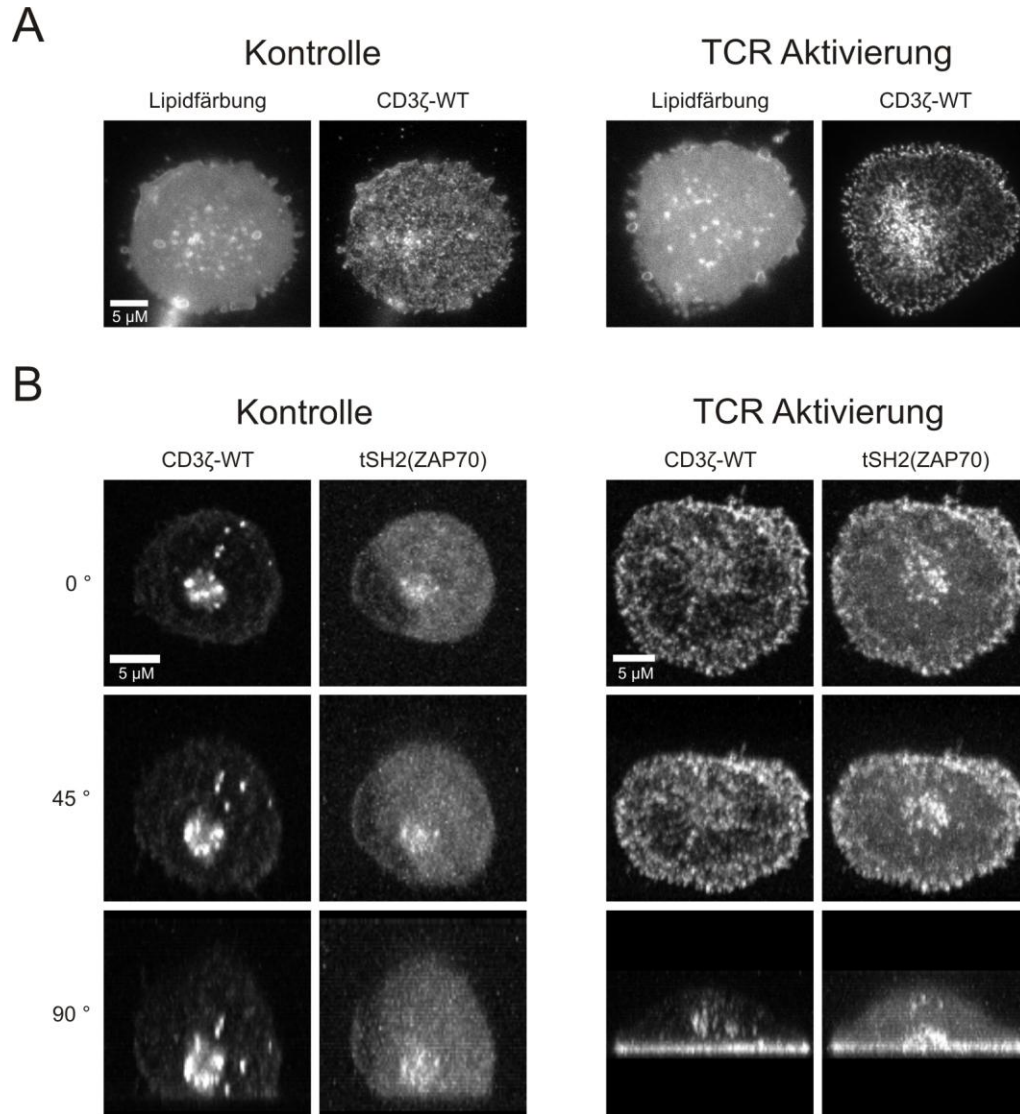


Abbildung 24 Inaktive T-Zellen zeigen geclusterten TCR, aktivierte Zellen zeigen Mikrocluster und Polarisierung des TCR

Das Verteilungsmuster des TCR in ganzen Zellen und in der Plasmamembran wurden mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem CD3ζ-WT sichtbar gemacht. **(A)** CD3ζ-WT-mEGFP transfizierte Jurkat E6.1 T-Zellen adhärten auf PLL-beschichteten Deckgläser 30 min bei 37 °C, *Membrane Sheets* wurden erstellt und mit PFA fixiert. Die Zellen wurden aktiviert indem die Deckgläser zusätzlich zu PLL mit 5 µg/ml Okt3 beschichtet wurden. Nach Aktivierung waren zentral ausgerichtete Mikrocluster sichtbar. **(B)** Konfokale Mikroskopie mit 3D-Rekonstruktion wurde an ganzen Zellen durchgeführt, die mit CD3ζ-WT-mEGFP und mCherry-tSH2(ZAP70) transfiziert worden waren. Nach Aktivierung lokalisierte der phosphorylierte TCR hin zur aktivierenden Oberfläche und bildet zentral ausgerichtete Mikrocluster aus.

5.1.2 TCR-Cluster in aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen auf mobilen Oberflächen

Nachdem charakterisiert worden war wie sich der TCR in aktivierten und nicht-aktivierten Zellen und *Membrane Sheets* darstellte, sollte der nächste Schritt hin zur Initialisierung einer Immunologischen Synapse (IS) gemacht werden.

Damit eine IS in T-Zellen beobachtet werden kann, müssen diese an aktivierende Proteine auf einer lateral mobilen Oberfläche binden und adhären. Kostimulatorische Reize müssen gesetzt werden damit sich der TCR zu Clustern zusammenführt und eine vollständige IS ausbildet (Grakoui *et al.* 1999; Dustin & Groves 2012). Diese TCR-Cluster können durch aktivierende Antikörpern gegen Teile des TCR (α TCR z. B. Okt3, Hit3a) induziert werden. Zusätzlich benötigt man eine Kostimulation des Integrins LFA1 (Integrin beta-2) durch das Adhäsionsmolekül ICAM1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) (Wülfing *et al.* 1998; Carrasco *et al.* 2004) (siehe auch Kapitel 2.2.4 ff.)

Als aktivierend wirkende mobile Oberfläche für T-Zellen können Supported Lipid Bilayers (SLB) verwendet werden (Nye & Groves 2008; Yu *et al.* 2010). Dazu werden Liposomen, bestehend aus den Lipiden DOPC (98,8 %), DGS-NTA(Ni) (1 %) und Biotin CAP-PE (0,2 %) hergestellt, die bei Inkubation mit einem hydroxylierten Deckglas per self-assembly eine Supported Lipid Bilayer ausbilden (siehe Methoden 4.2.15). Unspezifische Bindungen an die SLB wurden mit BSA (Bovine Serum Albumin) verringert und dann Streptavidin an das Biotin CAP-PE gebunden. Diese mit Streptavidin und NTA(Ni) funktionalisierte Oberfläche diente der Bindung biotinylierter Antikörper (gegen Teile des TCR, z. B. Okt3 gegen CD3 ϵ) und achtfach His-markiertem ICAM1s (ICAM1- Δ TMR-mEGFP-Xa-8xHis) (Schema siehe Abbildung 25).

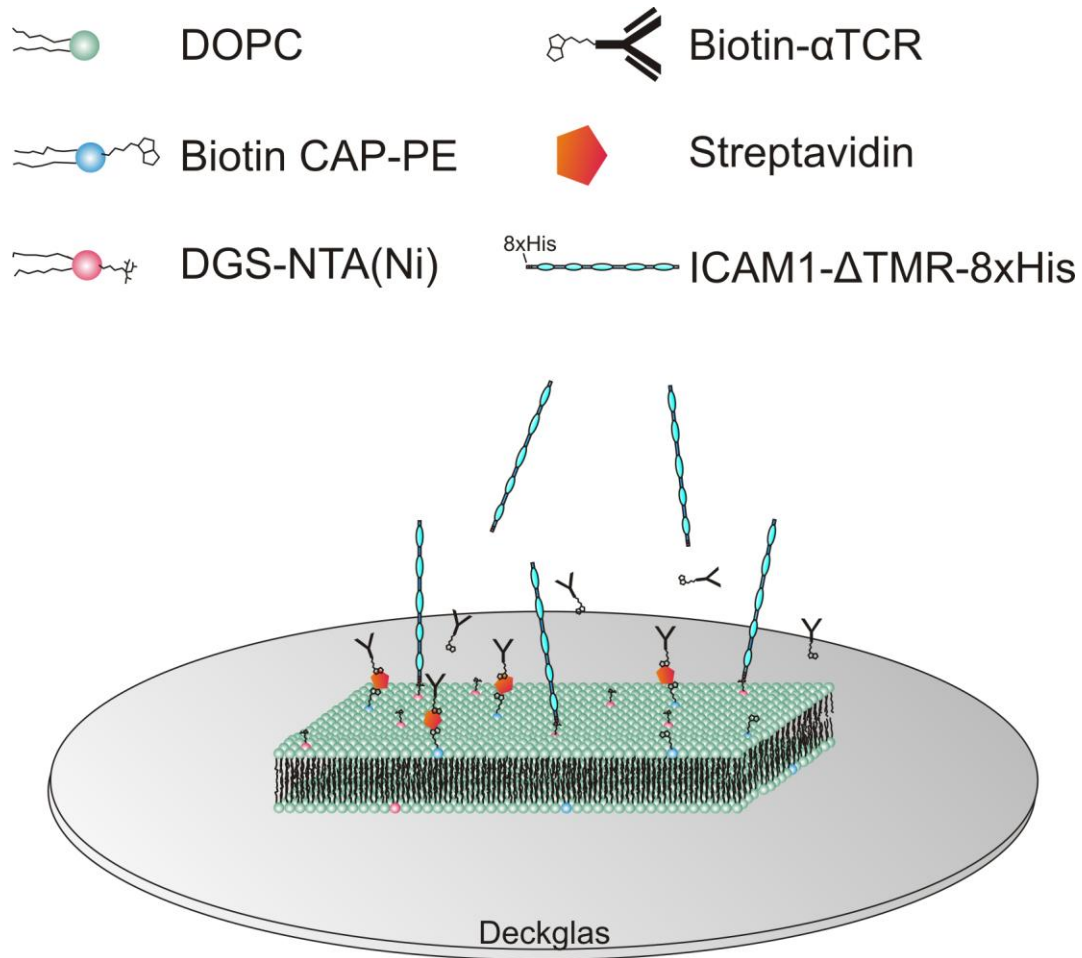


Abbildung 25 Schema einer aktivierenden *Supported Lipid Bilayer*

Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht auf einer hydroxylierten Glasoberfläche. Ein hydroxyliertes Deckglas wird mit unilamellaren Liposomen bestehend aus 98,8 % DOPC, 1 % DGS-NTA(Ni) und 0,2 % Biotin CAP-PE inkubiert. Es bildet sich eine Lipiddoppelschicht durch *self-assembly*. Anschließend wird die Lipiddoppelschicht sukzessive mit Streptavidin und ICAM1-ΔTMR-(mEGFP-)Xa-8xHis gemeinsam mit Biotin-αTCR (z. B. Biotin-Okt3) inkubiert.

An die *Supported Lipid Bilayer* (SLB) gebunden, wirken der αTCR und das ICAM1-Molekül aktivierend auf T-Zellen. Dies geschieht durch Aggregation des TCR (durch αTCR) und kostimulatorisch Bindung von LFA1 an ICAM1.

(Größenordnungen nicht maßstabsgetreu)

Proteinaufreinigung von ICAM1

ICAM1 wird als Kostimulator bei der Aktivierung von T-Zellen auf SLBs benötigt. Die Wildtypform des humanen ICAM1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*)(NP_000192) ist in Abbildung 26A schematisch dargestellt. Das Protein besteht aus 532 Aminosäuren und wurde mit einer Größe zwischen 76 kDa und 114 kDa, je nach Zelllinie in der es nachgewiesen wurde, angegeben (Staunton *et al.* 1988). Die beschriebenen Größenunterschiede gehen auf Glykosylierungen zurück. Der extrazelluläre Teil des Proteins besteht aus fünf „Ig-like C2-type“-Domänen, kann an zwei Stellen phosphoryliert und an neun Stellen glykosyliert werden. Außerdem enthält er sieben Intraprotein-disulfidbrückenbindungen.

Für die Bindung an eine Supported Lipid Bilayer musste das ICAM1-Protein funktionalisiert werden (Abbildung 25). Dazu wurde in der Nukleotidsequenz der Transmembran- und der Intrazellulärteil deletiert und an deren Stelle nur eine Sequenz für eine 8-fach Histidin-Abfolge oder noch zusätzliche eine mEGFP-Sequenz eingefügt (Abbildung 21). Durch das Entfernen der Transmembrandomäne werden trunkierte membranständige Proteine (Abbildung 26A) wegen ihrer Signalsequenz konstitutiv exozytiert. Aufgrund der artifiziell eingeführten Modifikationen des Proteins wurde ein Expressionssystem verwendet. Wegen der für die T-Zell-Erkennung notwendigen Glykosylierung des ICAM1 musste ein Säugetierexpressionssystem, in diesem Fall mit Hek293EBNA-Zellen, eingesetzt werden (beschrieben in Nye & Groves 2008). In einem prokaryotischen oder hefe-basierten System wären Glykosylierungen nicht oder nur teilweise angehängt worden.

Die Aufreinigung des rekombinant hergestellten, chimären ICAM1 wurde per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und zusätzlich per *Western Blot* überprüft. Sowohl in dem durch *Coomassie*-blau-gefärbtem SDS-PAGE als auch im *Western Blot* sind Proben von einzelnen Schritten der

Aufreinigungen von ICAM1- Δ TMR-Xa-8xHis bzw. ICAM1- Δ TMR-mEGFP-Xa-8xHis aufgetragen worden (Abbildung 26B und C). Zur Vergleichbarkeit der Proben unterschiedlicher Gele untereinander wurde darauf geachtet, dass die Volumina der Ausgangsproben zwischen den Gelen identisch waren. Es wurden jeweils Proben des grob papiergefilterten Zellüberstands (ZÜ), der beiden Waschschrte (W_1 und W_2), der umgepufferten (mit PD10-Säulen) Elution (E_2), der Elution vor Umpufferung (E_1) und des konzentrierten, umgepufferten Proteins (K) aufgetragen. Die Proben wurden im gleichen prozentualen Anteil des Ausgangsvolumens der einzelnen Schritte aufgetragen, so dass die Signalstärke verschiedener Proben innerhalb der Gele vergleichbar war und die Aufreinigung nachvollzogen werden konnte (z. B. 250 ml ZÜ -> 1 ml Probe, Faktor 1:250; 10 ml Eluat -> 40 μ L Probe, Faktor 1:250, per TCA-Fällung wurden die Volumina konzentriert, um sie im PAGE auftragen zu können).

Das *Coomassie* Gel zeigte, dass die Aufreinigung erfolgreich war (Abbildung 26B). Die im Zellüberstand vorhandenen unspezifischen Proteine, sichtbar in Form von Banden in der ZÜ-Spalte, hatten nicht an die Ni-NTA-Agarose gebunden. Dies ist aus dem Eluat E_1 ersichtlich, da dort keine Banden zusätzlich zu der jeweiligen ICAM1-Bande (~90 kDa bzw. ~115 kDa) erschienen. Es ist erkennbar, dass die Waschschrte nicht zu stringent gewählt worden waren, da das ICAM1 in den Waschproben nur als schwache Banden auftrat und der Großteil des Proteins in der Spalte der Elution sichtbar war. Das eluierte Protein lag nicht degradiert vor, da sonst in der *Coomassie*-Färbung kleinere Banden oder verschmierte Signale erkennbar gewesen wären.

Der Antikörper des *Western Blots* gegen ein His-Epitop (Abbildung 26C) wies spezifisch das 8x His-markierte ICAM1 nach. Die im *Coomassie* Gel detektierten Banden wurden daher als ICAM1- Δ TMR-Xa-8xHis bzw. ICAM1- Δ TMR-mEGFP-Xa-8xHis verifiziert. Die beobachteten Größen für ICAM1-

Δ TMR-Xa-8xHis und ICAM1- Δ TMR-mEGFP-Xa-8xHis lagen bei ~90 kDa bzw. ~115 kDa.

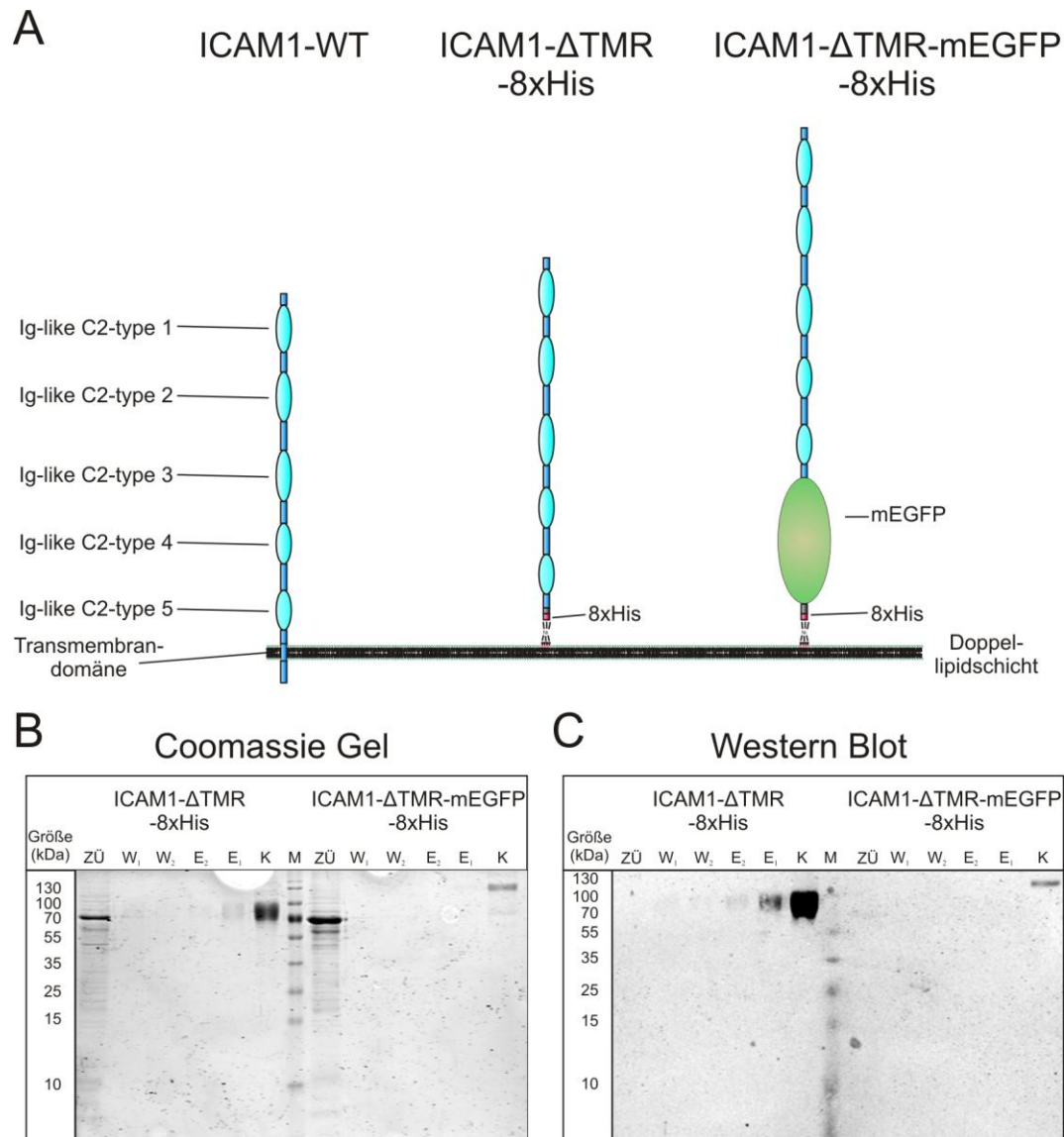


Abbildung 26 Expression und Aufreinigung des Adhäsionsmoleküls ICAM1

(A) Schematischer Aufbau von ICAM1 als Wildtypprotein (ICAM1-WT) und als chimäre Proteine (ICAM1- Δ TMR-8xHis und ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis). ICAM1-WT besteht aus fünf immunoglobulin-ähnlichen Domänen (*Ig-like C2-type*) einer Transmembrandomäne (TMD) und einem intrazellulären Stück. Es hat 532 Aminosäuren und wird glykosyliert und wurde mit einer Größe von 76 – 114 kDa beschrieben. Für die SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung **(B)** bzw. Western Blot **(C)** (α His) wurde als Proben je anteilig die gleiche Menge an Ausgangsvolumen des jeweiligen Aufreinigungsschrittes verwendet (ZÜ; Zellüberstand, W₁; Waschschrift 1, W₂; Waschschrift 2, E₂; Eluat 2 nach Umpuffern (dadurch 1,4-fach verdünnt gegenüber E₁), E₁; Eluat 1 vor Umpuffern und K; Konzentrat [28-fach konzentriert gegenüber E₂ bzw. 20-fach gegenüber E₁]).

Die Bande von ICAM1- Δ TMR-8xHis lag bei ~90 kDa (siehe (A) und (B), E₂ und K), ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis hatte, wie berechnet, die Größe ~115 kDa (siehe (A) und (B), E₂ und K) (GFP = 26,9 kDa). Das *Coomassie* Gel zeigte gute Bindung und Reinigung der Proteine. Im *Western Blot* sieht man, dass keine N-terminalen Abbauprodukte entstanden.

Erstellung einer mobilen Oberfläche in Form einer *Supported Lipid Bilayer*

Um T-Zellen eine IS mit einer artifiziellen, kontrollierbaren Oberfläche, die die Rolle der APC übernimmt, ausbilden zu lassen wurde im nächsten Schritt ICAM1 zur Erstellung einer funktionellen SLB verwendet. Es wurde überprüft, welche Lipidkonzentrationen für die Ausbildung einer intakten Lipidschicht nötig waren (Abbildung 27A). Dazu wurden Liposomen in Konzentrationen von 0,03 mg/ml, 0,31 mg/ml und 2,0 mg/ml in 5 μ l-Tropfen auf ein hydroxyliertes Deckglas gegeben und 30 min inkubiert (Kapitel 4.2.15). Die überschüssigen Liposomen wurden gewaschen und der Lipidfarbstoff TMA-DPH hinzugefügt. TMA-DPH ist ein lipophiler Farbstoff, der teilweise wasserlöslich ist und bei Insertion in lipophile Bereiche seine Fluoreszenz dramatisch erhöht (Illinger *et al.* 1989) und bei Belichtung schnell bleicht. Diese kombinierten Eigenschaften wurden benutzt um durchgängige Membranbereiche zu identifizieren. Denn inseriertes fluoreszierendes TMA-DPH konnte ausgebleicht werden und wurde durch Austausch mit nicht-gebleichtem TMA-DPH der wässrigen Phase ersetzt. Dieser Vorgang diente zur Überprüfung, ob die blaue Fluoreszenz der SLBs tatsächlich von TMA-DPH verursacht wurde und falls dies der Fall war, zur Dokumentation dass die Membranen durchgängig waren.

Die Aufnahmen in A (Abbildung 27) zeigen liposomen-inkubierte Deckgläser, die mit TMA-DPH inkubiert wurden und die nach einer ersten Aufnahme für einige Sekunden mit starker Lichtintensität gebleicht wurden. Anschließend wurden nach fünf und zehn Sekunden erneut Aufnahmen mit geringer Lichtintensität gemacht. Jedes der, mit unterschiedlichen Liposomenkonzentrationen inkubierten, Deckgläsern wies lipophile Bereiche

auf. Der Bleichschritt und die wiederkehrende Fluoreszenz bewiesen, dass Autofluoreszenz von Verunreinigungen als Ursache des lipophilen Signals ausgeschlossen werden konnte. Bei Inkubation mit einer Liposomenkonzentration von 2,0 mg/ml wurde eine durchgängige Lipidschicht ausgebildet.

Nachdem die optimale Liposomenkonzentration zur Erstellung einer intakten Lipidschicht verifiziert worden war, wurden an die SLBs ICAM1 und Streptavidin gebunden. Dazu wurde eine SLB mit 11 µg/ml (100 nM) ICAM1-ΔTMR-mEGFP-Xa-8xHis und 2 µg/ml Streptavidin-AlexaFluor®594 10 min in HBS* (siehe S. 72) inkubiert, die Überschüsse gewaschen und die SLB fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 27B). Die Aufnahmen der TMA-DPH-Färbung ließen eine überwiegend intakte Membran erkennen, mit nur kleinen Fehlern, die als dunkle Punkte erschienen. Weitere Aufnahmen zeigten, dass gebundenes ICAM1 uniform verteilt war wohingegen Streptavidin eine strukturierte Erscheinung hatte. Die Bilder ließen erkennen, dass die Proteine spezifisch an die SLB gebunden hatten und nicht an das Glas, da Fehler in der Membran, erkennbar als dunkle Punkte, nicht mit Protein bedeckt waren.

Als letzte Komponente einer funktionellen SLB musste Anti-TCR-Antikörper an die Membran gebunden werden. Nachdem die spezifische Bindung von ICAM1 und Streptavidin gezeigt worden war, wurde erneut eine SLB mit Streptavidin-AlexaFluor®594 beladen und nach einem Waschschrift für 30 min mit 5 µg/ml Biotin-Okt3 (Antikörper gegen einen Teil des TCR) inkubiert. An die SLB gebundenes Biotin-Okt3 wurde mit einem Alexa488-gekoppelten Antikörper gefärbt und die Fluoreszenz mikroskopisch erfasst (Abbildung 27C). Durch den Vergleich von lipidfreiem Hintergrund des Deckglases mit der Lipidschicht konnte man in den Fluoreszenzkanälen von Biotin-Okt3 und Streptavidin deren spezifische Bindung an die SLB erkennen. Bereiche am Rande der SLB zeigten keine Bindung, was auf eine durch Phasenseparation geschaffene Zone ohne Bindungsstellen zurückgehen könnte.

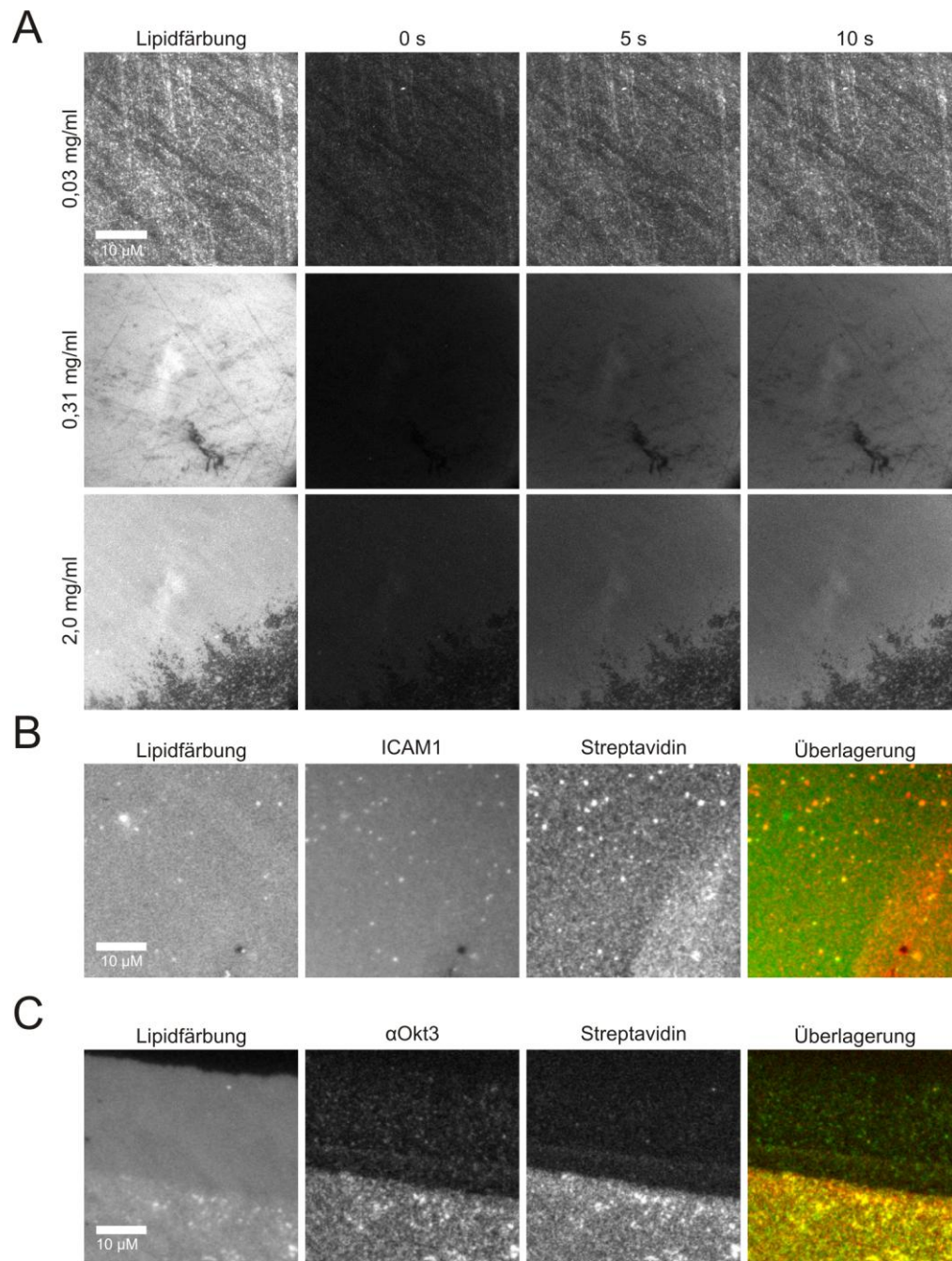


Abbildung 27 Optimierung des Erstellungsprozesses einer *Supported Lipid Bilayer*

(A) Bestimmung der benötigten Liposomenkonzentration zur Erstellung einer *Supported Lipid Bilayer* (SLB). Hydroxylierte Deckgläser wurden für 2 h mit Liposomensuspensionen verschiedener Konzentrationen inkubiert und anschließend gewaschen. Die Lipidschicht wurde mit TMA-DPH sichtbar gemacht, für 3 s gebleicht und nach 5 s sowie 10 s die wiederkehrende Fluoreszenz aufgenommen. Bei 2 mg/ml Liposomensuspension entstand eine durchgehende Lipiddoppelschicht. **(B)** Die SLB wurde mit 11 µg/ml ICAM1-ΔTMR-mEGFP-8xHis (grün) & 2 µg/ml Streptavidin-AlexaFluor®594 (rot) für je 10 min inkubiert und danach gewaschen. Sowohl ICAM1 als auch Streptavidin banden an die SLB. **(C)** Eine SLB mit gebundenem Streptavidin-AlexaFluor®594 (rot) wurde mit 5 µg/ml Biotin-Okt3 30 min

inkubiert und anschließend Okt3 mit einem α -mouse AK-AlexaFluor®488 sichtbar gemacht (grün). Wie anhand der Überlagerung des grünen und roten Kanals zu erkennen ist hat Biotin-Okt3 über Bindung an Streptavidin spezifisch an die SLB gebunden.

Nachdem gezeigt wurde, dass ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis, Streptavidin und der α TCR an die SLB binden, wurde die Mobilität der gebundenen Komponenten gemessen um zu verifizieren, dass sich diese wie erwartet lateral in der Membran bewegen können. Per FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) wurden die Diffusionskoeffizienzen von ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis und Streptavidin vor und nach Bindung des α TCR bestimmt (Abbildung 28). Die Graphen in A und B spiegeln die wiederkehrenden Fluoreszenzintensitäten von ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis und Streptavidin-AlexaFluor®594 nach vorherigem Bleichen wider. Als 100 % Fluoreszenz wurde die vor dem Bleichen gemessene Fluoreszenzintensität der beiden Komponenten definiert. Experimente, bei denen nur ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis und Streptavidin-AlexaFluor®594 an die SLB gebunden waren, sind in A gezeigt. Im Anschluss an diese Messungen wurde zusätzlich 10 min mit 5 μ g/ml α TCR (Okt3 oder Hit3a) inkubiert und erneut FRAP-Messungen durchgeführt (gemessene Daten siehe Abbildung 28B).

Vor der Bindung des α TCR an die SLB lagen die Bleicheffizienzen für ICAM1 bei ca. 80 % und für Streptavidin bei ca. 55 % (Abbildung 28A). Die geringere Bleicheffizienz des Streptavidin wurde durch die Kopplung an ein längerwelliges Fluorophor hervorgerufen, da solche bleichresistent sind. Stärkeres Bleichen war aufgrund von Intensitätslimitationen der eingesetzten Laser nicht möglich. Die wiederkehrenden Fluoreszenzen beider Proteine, die jeweils die mobile Proteinfraction darstellten, wiesen beide ein Plateau bei dem Maximalwert von ~80 % auf. Folglich lag die Fraktion der immobilen Proteine jeweils bei 20 %.

Nach α TCR-Bindung, wies der Graph von ICAM1 die gleichen Charakteristika wie vor der Zugabe auf (Abbildung 28B), jedoch hatte sich

die Kurve für Streptavidin abgeflacht und die Fluoreszenz erreichte nur noch einen Maximalwert von 70 %.

Aus den Graphen der einzelnen Tage wurden die Halbwertszeiten, die maximal wiederkehrende Fluoreszenz und der daraus resultierende Diffusionskoeffizient berechnet (Kapitel 4.2.16, S. 75). Beim Vergleich der ermittelten Diffusionskoeffizienten vor und nach α TCR-Bindung wurde deutlich, dass die laterale Diffusion von ICAM1 nicht beeinflusst wurde (Abbildung 9C). Die Diffusionswerte waren etwas geringer als in der Literatur angegeben (vergleiche mit Shen *et al.* 2009), wobei angemerkt werden muss, dass an einem Versuchstag der Wert vom in der Literatur publiziertem Wert von $0,39 \mu\text{m}^2/\text{s}$ stark nach unten abgewichen ist wobei die beiden weiteren Datensätze einen Diffusionskoeffizienten von $0,34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bzw. $0,38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ergaben.

Ebenso waren auch die Diffusionskonstanten von Streptavidin etwas kleiner als die publizierten Werte von $0,37 \mu\text{m}^2/\text{s}$ vor, bzw. $0,23 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nach α TCR-Bindung, es war aber auch eine Mobilitätseinschränkung nach α TCR-Bindung zu beobachten. Um zu ermitteln, ob die geringere Diffusionsfähigkeit durch Mehrfachbindung des, an den α TCR gekoppelten, Biotins an das Streptavidin hervorgerufen wird und dadurch große, weniger mobile Aggregate entstünden, wurde freies Biotin als Kompetitor hinzugegeben. Dadurch sollte der Großteil der Streptavidin-bindungsstellen von einzelnen Biotinmolekülen gebunden werden und die Wahrscheinlichkeit der Mehrfachbindung biotinylierter Antikörper und somit der Aggregationsbildung vermindert werden. Dies hatte keinen Einfluss auf die Diffusionseigenschaften des Streptavidins (nicht gezeigt) und folglich konnte die Aggregation des Streptavidins aufgrund von mehrfach-biotinylierten Antikörpern ausgeschlossen werden.

Die Bindung von biotinyliertem Antikörper an die SLB beeinflusste nicht die laterale Diffusion von ICAM1 wie zu erwarten war. Jedoch war, wie in der

Literatur von Shen *et al.* 2009 beschrieben ein Abfall der Mobilität von Streptavidin nach α TCR-Bindung zu verzeichnen. Die Werte für die gemittelten Diffusionskoeffizienten von ICAM1 und Streptavidin waren etwas geringer als bei Shen *et al.* 2009 angegeben (siehe Abbildung 9C).

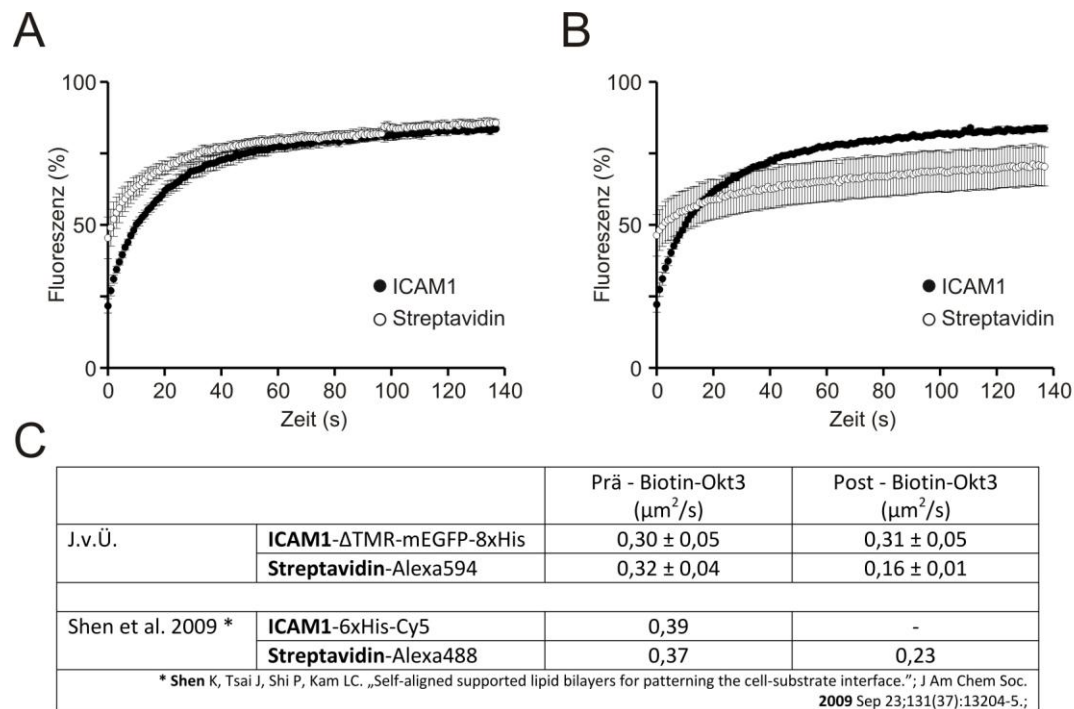


Abbildung 28 Das Diffusionsverhalten von Komponenten der erstellten *Supported Lipid Bilayer* ist vergleichbar mit SLB-Systemen, die Immunologische Synapsen induzieren

(A, C) Mobilitätsmessungen per FRAP an *Supported Lipid Bilayers*. ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis und Streptavidin-Alexa594 wurden an Lipidschichten gebunden und FRAP-Messungen durchgeführt. (B, C) Anschließend wurden die *Supported Lipid Bilayers* mit Biotin-Okt3 (α TCR) inkubiert (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 min) und die Messungen wiederholt (Experimente $n = 3-4$, Messungen pro Experiment = 5-10, SEM). (C) Die ermittelten Werte für das Diffusionsverhalten der Komponenten lagen in der Größenordnung publizierter Daten (Shen *et al.* 2009).

Aktivierung von Jurkat T-Zellen auf einer *Supported Lipid Bilayer*

Nachdem eine SLB mit den erforderlichen Charakteristika erfolgreich etabliert worden war, wurde ihre Fähigkeit zur Induktion einer Immunologischen Synapse (IS) überprüft. Jurkat E6.1-T-Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml in Ringerlösung bei 37 °C auf der

aktivierenden SLB inkubiert (siehe Kapitel 4.2.15, S. 72). Nach Adhäsion der untransfizierten Zellen sollte die Ausbildung einer IS anhand der lateralen Reorganisation von ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis als pSMAC- und Streptavidin-AlexaFluor®594 als cSMAC-förmige Struktur beobachtet werden können (Abbildung 29).

Aus der Beobachtung, dass sowohl ICAM1 als auch Streptavidin, in der Kontaktstelle der T-Zelle mit der SLB, zu Clustern zusammengezogen wurden, kann man schließen dass die Jurkat E6.1-Zellen mit den SLB-gebundenen Proteinen interagierten (Abbildung 29A, obere Reihe). Andere Zellen zeigten, dass ICAM1 durch Ausschluss aus dem zentralen Bereich der Zellkontaktfläche eine ringförmige, konzentrierte Struktur auf der SLB ausbildete. Streptavidin wies clusterartige, wie auch ringförmige Strukturen und ein zentralisiertes Supracluster auf (Abbildung 29A, untere Reihe). Dieses Supracluster war jedoch nicht so kompakt und abgegrenzt wie für Immunologische Synapsen z. B. bei Grakoui *et al.* 1999 und Bromley *et al.* 2001 beschrieben.

Die Adhäsion der T-Zellen auf der SLB und die damit verbundene Reorganisation der Proteine ICAM1 und α TCR wurde auch zeitlich aufgelöst untersucht (Abbildung 29B). Man erkennt durch Betrachtung der Aufnahmen im Lipidkanal, dass sich die Zelle beim Anhaften an die SLB stark spreizt und Lamellopodien ausgebildet hatte. Es folgte eine Kontraktion der Zelle und eine Reduktion der Lamellopodien. Im Kanal des GFP-markierten ICAM1 erkennt man wie dieses aus der Peripherie der Kontaktstelle in den zentralen Bereich transportiert wurde. Dabei bildete sich nach 15 min in einer der Zellen eine zentrale, ringartige, konzentrierte Struktur des ICAM1 aus. Der Ausschluss von ICAM1 aus dem Zentrum der Zellkontaktstelle war nur unvollständig. Streptavidin wurde nur in einer Zelle beeinflusst, in der anderen Zelle blieb die Oberfläche der SLB unverändert. Das Streptavidin erfuhr eine partielle Separierung vom ICAM1, wobei es jedoch nicht zur Ausbildung eines distinkten, zentralen Supraclusters (cSMACs) kam.

Um zu überprüfen, ob verschiedene aktivierende Antikörper die T-Zellen unterschiedliche stark aktivieren und somit Einfluss auf die Ausbildung einer IS haben, wurden Okt3 (Abbildung 29A unten und B) und Hit3a (Abbildung 29A oben)(Yu *et al.* 2010) eingesetzt. Ebenso wurden auch koaktivierende Antikörper gegen CD28 eingesetzt, aber es konnten in beiden Fällen keine Unterschiede bei der Kontraktion der Proteine und somit bei der Ausbildung einer IS beobachtet werden (nicht gezeigt).

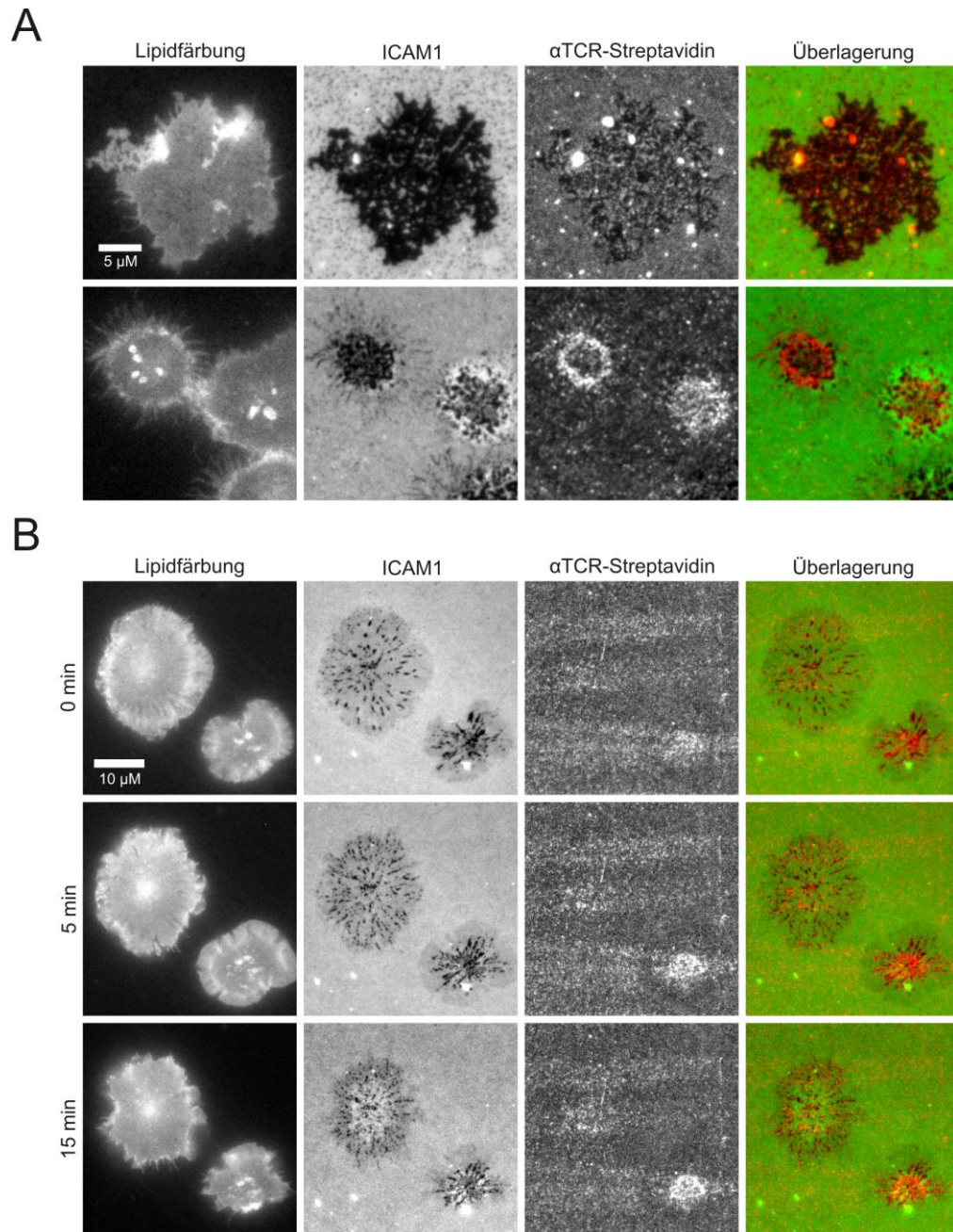


Abbildung 29 Unvollständige Segregation von ICAM1 und α TCR nach Jurkat T-Zellkontakt

(A) Jurkat E6.1-Zellen wurden für 5 min in Ringer auf einer aktivierenden SLB (mit gebundenem ICAM1- Δ TMR-mEGFP-8xHis und Biotin- α TCR--Streptavidin-AlexaFluor®594 inkubiert um zu adhären. Die Zellen bewirkten die Ausbildung von ICAM1-Mikroclustern (obere Reihe) und bildeten teilweise ringförmige Strukturen auf der SLB. Der an das Streptavidin gebundene α TCR zeigte ebenfalls Mikrocluster (obere Reihe) und unvollständig zentralisierte Strukturen (untere Reihe).

Für die Experimente der in der oberen und unteren Reihe exemplarisch gezeigten Bilder wurden unterschiedliche α TCRs (Okt3 und Hit3a) verwendet, die grundsätzlich gleiche Phänotypen initiierten.

(B) Zeitreihe des in (A) beschriebenen Prozesses. Ausbildung der Mikrocluster und die Zentralisierung von ICAM1 und α TCR konnte beobachtet werden.

Die Visualisierung der TCR-Verteilung mit Hilfe von Antikörpern war unter Umständen aufgrund von Zugänglichkeitsproblemen unzuverlässig. Außerdem war die Betrachtung der IS per SLB-gebundener Proteine wegen des indirekten Nachweisen nicht optimal. Daher sollte unmittelbar in der Zelle mittels CD3 ζ -WT-mEGFP (stellvertretend für den TCR) eine IS beobachtet werden. Dazu wurden Jurkat E6.1-Zellen 48 h vor Benutzung mit CD3 ζ -WT-mEGFP transfiziert und auf einer aktivierenden SLB (mit ICAM1- Δ TMR-8xHis und Streptavidin-AlexaFluor®594 mit gebundenem Biotin- α TCR) in Ringerlösung inkubiert (siehe Abbildung 30).

Die lebenden Zellen wurden mittels TIRF-Mikroskopie untersucht und die, für eine Aktivierung charakteristischen, TCR-Mikrocluster waren sichtbar (Abbildung 30A, obere Reihe). In den meisten Fällen waren diese die einzigen Anzeichen für T-Zell-Aktivierung und Strukturen, die Immunologischen Synapsen ähneln (Abbildung 30A, untere Reihe), wurden nur selten beobachtet. Die Ausbildung dieser IS-ähnlichen Strukturen waren, wie schon in Abbildung 29B beobachtet, nicht so frequent, distinkt und vollständig wie in den Veröffentlichungen beschrieben (Grakoui *et al.* 1999; Yokosuka *et al.* 2005; Nye & Groves 2008).

Die intrazelluläre Verteilung des TCR, nach fast einstündiger Adhäsion von Jurkat E6.1-Zellen auf einer aktivierenden SLB, wurde durch konfokale Mikroskopie überprüft und ein 3D-Stapel der Zelle konstruiert (Abbildung 30B). In der Aufsicht kann man die Mikrocluster sehen, die CD3 ζ -mEGFP, und somit den TCR, beinhalten. Ein cSMAC wurde nicht ausgebildet, da die Cluster nicht komplett kondensiert vorlagen und noch Unterbrechungen innerhalb der geclusterten Struktur sichtbar waren. Intrazellulär war der TCR zur Zellkontaktstelle, mit der SLB, hin ausgerichtet (Abbildung 30B,

Seitenansicht). In diesem Fall hatte die Zelle nicht mit dem fluoreszenzmarkierten Streptavidin interagiert, dieses war immer noch uniform auf der SLB verteilt (Abbildung 30B).

Insgesamt konnten SMAC-ähnliche Strukturen nur sehr selten, sowohl auf Seite der SLB (Abbildung 29) als auch auf Seiten der T-Zellen (Abbildung 30), beobachtet werden. Bei ~50-100 hergestellten aktivierenden SLBs und jeweils über 30-minütiger Inkubation von Jurkat E6.1-Zellen ($\sim 3 \times 10^6$ Zellen/SLB), wurden insgesamt nur 5-10 Zellen mit cSMAC-ähnlichen Strukturen beobachtet. Auch bei längerer Inkubation der T-Zellen, von mehr als einer Stunde, wurden nur sehr selten IS-ähnliche Strukturen ausgebildet (siehe Abbildung 30).

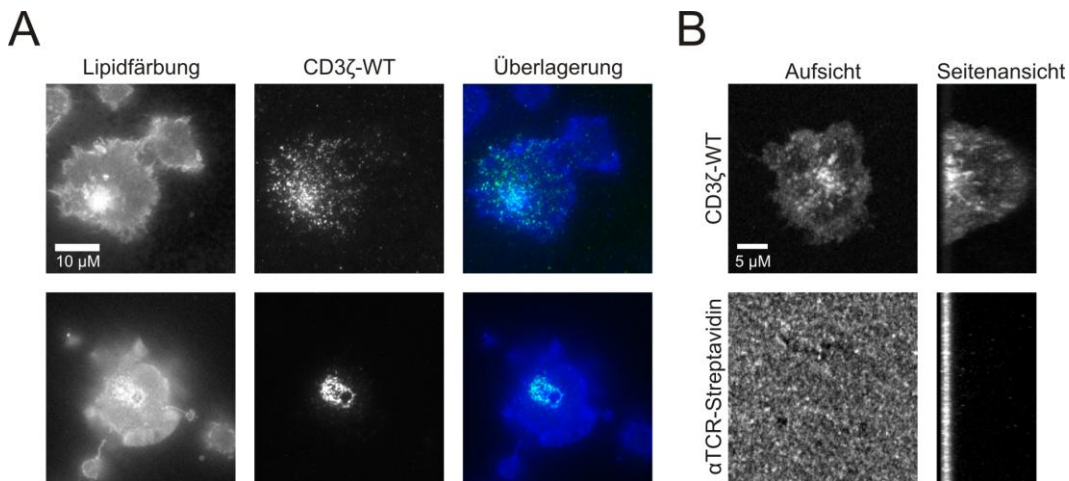


Abbildung 30 Zentrale Aggregationen des TCR (cSMACs) konnten auch nach langer Inkubation nur extrem selten beobachtet werden

(A) Auf einer SLB mit ICAM1-ΔTMR-8xHis und Streptavidin-Biotin-αTCR wurden transfizierte Jurkat E6.1 T-Zellen (CD3ζ-WT-mEGFP) inkubiert und adhärten. TIRF-Mikroskopie machte Mikrocluster sichtbar (obere Reihe, 39 min Inkubation), aber nur sehr selten auch zentralisierte Strukturen (untere Reihe, 66 min Inkubation), die einem cSMAC ähnelten.

(B) Transfizierte Jurkat E6.1-Zellen wurden wie in (A) auf einer dotierten SLB adhärten (48 min), bei der jedoch das Streptavidin fluoreszierend war. Im konfokalen Mikroskop (und der 3D Rekonstruktion der Zelle) war erkennbar, dass sich Mikrocluster und eine zentralisierte Anordnung dieser ausbildete.

Vorbereitend für weitere Untersuchung des TCR in SLB-aktivierten T-Zellen wurden *Membrane Sheets* auf den SLBs hergestellt. Mit dieser Methode sollte es möglich sein Fragen hinsichtlich der Internalisierung des TCR im Verlauf der Aktivierung zu untersuchen. Dazu wurden erneut Jurkat E6.1-Zellen mit CD3 ζ -WT-mEGFP transfiziert und auf einer aktivierenden SLB adhäriert. Die *Membrane Sheets* wurden wie in Kapitel 4.2.15 auf S. 73 beschrieben hergestellt und mikroskopisch observiert (Abbildung 31).

Durch Betrachtung der SLB, mit den darauf liegenden *Membrane Sheets*, in unterschiedlichen Fokusebenen wurde ausgeschlossen, dass es sich noch um intakte Zellen handelte (vergleiche obere und untere Reihe in Abbildung 31). Bei den Aufnahmen, der in der Fokusebene liegenden SLB (Abbildung 31, obere Reihe), ist in der Lipidfärbung zu erkennen, dass die SLB größtenteils intakt war und nur ein ringförmiger Bereich um die vormalige Zelle nicht von einer SLB bedeckt war.

Dieser Eindruck wurde bei Betrachtung des gefärbten Streptavidins und GFP-markierten CD3 ζ bestätigt. Auf der Innenseite des ringförmigen, dunklen Bereiches war fluoreszenzmarkiertes Streptavidin an die SLB gebunden. Wäre die SLB zerstört worden, so hätte sich das SLB-assoziierte Streptavidin ebenfalls gelöst. Auch waren im Kanal des GFP-markierten CD3 ζ -WT clusterförmige Strukturen im Bereich der ehemaligen Zelle zu sehen. Dies bewies eindeutig, dass in diesem Bereich die ehemalige Plasmamembran (*Membrane Sheet*) noch vollständig war, da CD3 ζ -WT mit einer Transmembrandomäne in der Doppellipidschicht verankert war. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Lipidphase der Plasmamembran entfernt wurde, jedoch die darin verankerten Proteine weiterhin anhafteten. Eine solche Separierung von Lipiden und Proteinen konnte bisher bei der *Membrane Sheet* Herstellung noch nicht beobachtet werden.

Die untere Bildreihe wurde bei in Z-Achse erhöhtem Fokus aufgenommen. Man erkennt, dass die erkennbaren Strukturen außerhalb des Fokus lagen.

Wäre eine intakte Zelle und nicht ein *Membrane Sheets* vorhanden gewesen, so wären intrazelluläre Strukturen bzw. mindestens die Plasmamembran als Ring sichtbar gewesen.

Generell ist es also möglich, wenn auch technisch anspruchsvoll, auf einer SLB *Membrane Sheets* herzustellen und die in 4.2.4 beschriebenen Vorteile und Anwendungsmöglichkeiten zu nutzen.

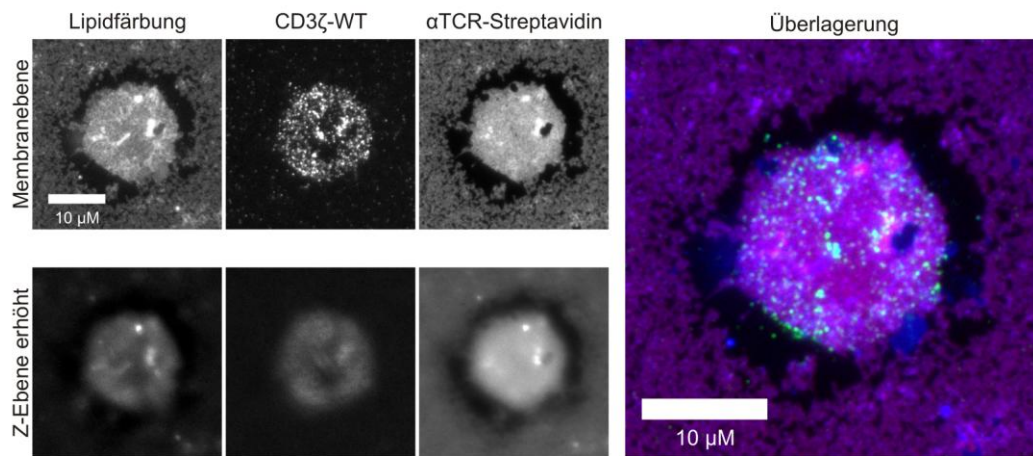


Abbildung 31 Die Herstellung von *Membrane Sheets* aus Jurkat E6.1 T-Zellen ist auf mobilen Oberflächen möglich

Nach Adhäsion einer transfizierten Jurkat E6.1-T-Zelle (CD3ζ-WT-mEGFP) auf einer funktionellen SLB wurde der Zellkörper per Ultraschallimpuls bis auf die basale Membran entfernt. Das Vorhandensein der basalen Membran wurde durch das GFP-Signal bestätigt, da die markierten Proteine Transmembrandomänen besaßen. Die untere linke Reihe zeigt, dass es sich tatsächlich um *Membrane Sheets* handelte, da bei Verschiebung der Fokusebene alle sichtbaren Strukturen außerhalb des Fokus lagen.

Streptavidin wurde wahrscheinlich teilweise durch den Ultraschallimpuls von der SLB entfernt und war unterhalb der Zelle durch diese geschützt. Daher ist im Bereich des *Membrane Sheets* mehr Streptavidin als in der Umgebung gebunden.

5.2 Bedeutung zytosolischer CD3 ζ -Domänen und deren Interaktionspartner für das TCR-Clustern

Der TCR besteht aus 8 Untereinheiten, die sich aus TCR $\alpha\beta$ -, CD3 $\epsilon\gamma$ -, CD3 $\epsilon\delta$ - und CD3 $\zeta\zeta$ -Dimeren zusammenlagern (Schamel & Alarcón 2013). Es wurde gezeigt, dass Teile des TCR bei Aktivierung phosphoryliert werden (Baniyash *et al.* 1988). Die Phosphorylierungen finden an Tyrosinen der ITAM-Motive (Reth 1989) statt, von denen 10 Kopien innerhalb der CD3-Bestandteile vorhanden sind. Es wurde gezeigt, dass die Fusion dieser ITAM-Motive mit Domänen anderer Rezeptoren zu chimären Proteinen führt, die T-Zellen aktivieren können (Irving & Weiss 1991). Ein solches chimäres Protein, das die sechs ITAM-Motive von CD3 ζ enthielt, konnte durch artifizielle Stimulation T-Zell-Effektorfunktionen induzieren (Romeo *et al.* 1992).

Da CD3 ζ viele der ITAM-Motive des TCRs beinhaltet, und konstitutiv mit den restlichen TCR-Bestandteilen exprimiert wird (D'Oro *et al.* 2002), wurde es als Modell für den allgemeinen Einfluss der intrazellulären Domänen des TCR auf dessen Cluster- und Aktivierungsverhalten gewählt (siehe Kapitel 3). Außerdem ist bekannt, dass über geladene Reste Interaktionen der intrazellulären Teile von CD3 ζ mit der Plasmamembran bestehen, die im Laufe der TCR-Aktivierung aufgehoben werden (Aivazian & Stern 2000; Kuhns & Davis 2008). Diese Eigenschaften machten CD3 ζ und dessen intrazellulären Domänen zu einem idealen Untersuchungsobjekt um auch andere intrazelluläre Einflüsse auf das TCR-Clustern zu untersuchen, wie z. B. elektrostatische Wechselwirkungen.

5.2.1 Intrazellulär verkürzte CD3 ζ -Mutanten

Für die Untersuchungen zur Bedeutung der ITAM-Motive für das Verhalten und die Lokalisierung des TCR in der Plasmamembran, wurden chimäre, GFP-markierte Deletionsmutanten von CD3 ζ hergestellt. Diese sind als Schema in Abbildung 32A zu sehen. Es handelte sich dabei um die Proteine,

CD3 ζ -WT-mEGFP, CD3 ζ - Δ ITAM2+3-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP. Bei CD3 ζ -WT-mEGFP wurde an das C-terminale intrazelluläre Ende des Wildtypproteins ein mEGFP fusioniert. Für die Erstellung von Deletionsmutanten wurden sukzessive die ITAM-Motive deletiert und an ihre Stelle mEGFP fusioniert.

Für die korrekte Assemblierung des TCRs muss CD3 ζ als Dimer vorliegen (besprochen in Kapitel 2.2.2). Um zu überprüfen, ob die generierten CD3 ζ -Chimären diese Dimere ausbilden und in korrekter Größe von den Zellen hergestellt werden, wurden eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt (Abbildung 32B). Dazu wurden Jurkat E6.1-Zellen mit den CD3 ζ -Varianten CD3 ζ -WT-mEGFP, CD3 ζ - Δ ITAM2+3-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP transfiziert und die Zellen nach 2 Tagen lysiert gefolgt von SDS-PAGE und *Western Blot*-Analyse. Ein Teil der Proben war zuvor reduzierenden Bedingungen ausgesetzt worden um potentiell vorhandene Disulfidbrücken zu spalten.

Der *Western Blot*, für den denaturierte und reduzierte Proteine aufgetragen wurden, zeigte Banden, welche die Proteine in ihrer monomeren Form widerspiegeln (Abbildung 32B, rechter Teil). Mit einer Bande bei ~43 kDa zeigte CD3 ζ -WT-mEGFP eine Größe, die gut mit der vorhergesagten Masse von 45,7 kDa übereinstimmte. Die Berechnung der Masse erfolgte mit ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/appe/>; 20.03.13) und es wurden die 403 Aminosäuren des CD3 ζ -WT-mEGFP als Grundlage genommen. Auch CD3 ζ - Δ ITAM2+3-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP zeigten annähernd genau die kalkulierten Größen von 38,2 kDa bzw. 33,7 kDa. Bei CD3 ζ -WT-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP waren Abbauprodukte in den Zellen vorhanden, erkennbar an den zusätzlichen Banden bei 30 kDa und 32 kDa. Diese stammten nicht von unvollständig synthetisierten Proteinen, da sich das detektierte GFP am C-terminalen Ende befand und somit vom Antikörper unvollständig synthetisierte Proteine nicht zu detektieren waren.

Eine Verkürzung vom N-terminalen Ende war eher wahrscheinlich, was auf Proteine ohne TMR hindeutete und damit ein Grund für fehlende Oberflächenexpression hätte sein können. In späteren Experimenten wurde jedoch gezeigt, dass alle CD3 ζ -Chimären über GFP an der Oberfläche lokalisiert werden konnten (z. B. Abbildung 34), d. h. wenn in diesem Fall lösliche Abbauprodukte in der Zelle vorhanden waren, konnten diese vermutlich bei Analysen auf *Membrane Sheets* vernachlässigt werden.

Um die oben angesprochene Dimerisierung der CD3 ζ -Chimären verifizieren zu können wurden Zellen mit nicht-reduzierendem Puffer versetzt, um Disulfidbrücken, welche die potentiellen Dimere zusammenhalten, nicht durch Reduktion in Monomere aufzuspalten (Abbildung 32B, linker Teil). Anhand der *Western Blot*-Analyse konnte gezeigt werden, dass alle drei Fusionsproteine Homodimere bildeten, die anhand der Banden bei 91,4 kDa, 74,8 kDa und 67,4 kDa für CD3 ζ -WT-mEGFP, CD3 ζ - Δ ITAM2+3-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP erkennbar waren. Heterodimere mit endogenem CD3 ζ hätten Größen für CD3 ζ -WT-mEGFP, CD3 ζ - Δ ITAM2+3-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP von 64,3 kDa, 56,8 kDa bzw. 52,3 kDa aufgewiesen. Auf Höhe dieser Proteingrößen waren jedoch nur schwache Banden sichtbar, sodass die Fusionsproteine folglich überwiegend in heterodimerer Form vorlagen. Weitere Banden bei >100 kDa gingen wahrscheinlich auf heterooligomere TCRs zurück, die durch die Hitze-Denaturierung (siehe Methoden S. 66) nicht vollständig separiert worden waren.

Die Voraussetzungen für korrektes Assemblieren des TCR waren gegeben, sodass im nächsten Schritt die Oberflächenexpression und das Verhalten der CD3 ζ -Chimären im TCR untersucht werden konnte.

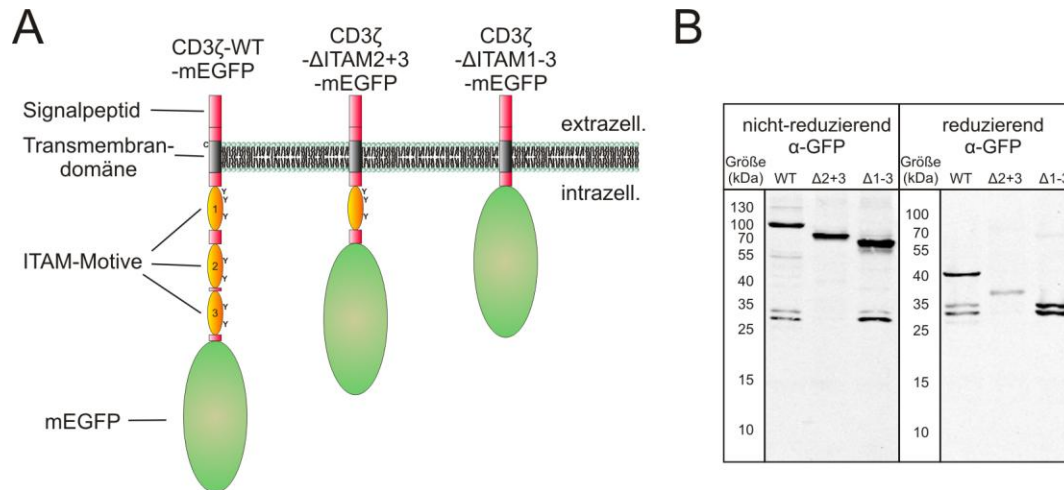


Abbildung 32 mEGFP-markiertes CD3ζ und ITAM-Deletionsmutanten von CD3ζ werden in vorhergesagter Größe als Dimere exprimiert

(A) Schema der CD3ζ-mEGFP-Konstrukte. CD3ζ-WT-mEGFP besteht aus 403 Aminosäuren (AS) (CD3ζ: 164 AS, mEGFP: 239 AS) und das Monomer hat eine Masse von 45,7 kDa (Homodimer: 91,4 kDa, Heterodimer mit endogenem CD3ζ: 64,3 kDa). Es besteht aus Signalpeptid, extrazellulärer Domäne, helikaler Transmembrandomäne und drei ITAM-Motiven mit je 2-3 phosphorylierbaren Tyrosinen. Der Mutante CD3ζ-ΔITAM2+3-mEGFP fehlen die ITAM-Motive 2 und 3 und es hat eine Masse von 38,2 kDa (Homodimer 74,8 kDa, Heterodimer: 56,8 kDa). Alle drei ITAM-Motive fehlen bei CD3ζ-ΔITAM1-3-mEGFP. Daraus ergeben sich als Monomer 33,7 kDa und als Homo- oder Heterodimer 67,4 kDa bzw. 52,3 kDa.

(B) Western Blot aus Zelllysaten von transfizierten Jurkat E6.1. Der Antikörper gegen GFP (αGFP) detektierte im Experiment unter nicht-reduzierenden Bedingungen vor allem Homodimere. Unter reduzierenden Bedingungen sah man Monomere. Die Doppelbanden bei ~30 kDa stammten wahrscheinlich von mEGFP-markierten Abbauprodukten.

Sortierung von GFP-markiertem CD3ζ-WT in die membranständigen TCR-Cluster

Nachdem biochemische Methoden gezeigt haben, dass die GFP-markierten Varianten von CD3ζ in den Zellen als Dimere vorlagen, wurde untersucht, ob diese korrekt in die TCR-Cluster der Plasmamembran sortiert werden. Denn durch das an CD3ζ angehängte GFP-Protein wäre es möglich, dass die korrekte Assemblierung von CD3ζ mit den anderen Komponenten des TCR durch sterische Hinderung unterdrückt würde. CD3ζ wäre somit trotz erfolgreicher Dimerisierung nicht Bestandteil des endogenen TCR in der Plasmamembran.

Um dies zu überprüfen wurde eine Pearsons Korrelationsanalyse zwischen CD3 ζ und Komponenten des TCR durchgeführt (wie von Manders et al. 1992 beschrieben) (siehe Methode 4.2.17, S. 78). Dazu wurde GFP-markiertes CD3 ζ -WT mit den RFP-markierten CD3 ϵ , CD3 γ und CD3 δ (Bestandteilen des TCR) in Jurkat E6.1-Zellen koexprimiert. Auf *Membrane Sheets* wurden Messareale gewählt und die Fluoreszenzsignale aus diesen wurden korreliert (beispielhaft als weiße Rechtecke in Abbildung 33A eingezeichnet).

In idealen Messsystemen würde eine 100%ige Übereinstimmung von GFP- und RFP-Signal einen Pearson Korrelationskoeffizient von 1,0 ergeben. Bei totalem Ausschluss der GFP-Proteine durch die RFP-markierten Proteine oder umgekehrt, betrüge der Koeffizient -1,0. Bei zufälliger Verteilung der Signale wäre ein Korrelationseffizient von 0,0 zu erwarten.

Diese theoretisch erreichbaren Werte des Pearsons Korrelationskoeffizienten sind in diesem Versuchsaufbau durch Messungenauigkeiten, biologische Variationen und den Anteil des endogenen CD3 ζ nicht zu erreichen. In einem vergleichbaren System von Sieber *et al.* 2006 wurde als maximale Korrelation für identische Syntaxin 1A-Proteine mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung ein Wert von 0,63 gemessen.

Die Koexpression von CD3 ζ -WT mit CD3 ϵ , CD3 γ , und CD3 δ zeigte bei Überlagerung der Bilder viele gelb gefärbte Bereiche (Abbildung 33A) woraus man auf eine starke Kolokalisierung der Proteine schließen konnte. Unterstützt wurde diese Beobachtung durch die gemessenen Werte für die Korrelationskoeffizienten von 0,43, 0,34 und 0,35 für CD3 ϵ , CD3 γ bzw. CD3 δ jeweils korreliert mit CD3 ζ -WT (Abbildung 33B). Im Vergleich mit anderen Proteinkorrelationen aus der Literatur (Sieber *et al.* 2006) waren diese Koeffizientenwerte als starke Kolokalisierung einzustufen. Dabei waren die gemessenen Werte erwartungsgemäß geringer, als der oben erwähnte Maximalwert von 0,63, da der TCR im Vergleich zu den homogenen Syntaxinclustern aus mehreren Proteinen unterschiedlichen Typs besteht. Dies verringert die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei fluoreszenzmarkierte

Zielproteine im gleichen TCR befinden, senkt die Kolokalisierungshäufigkeit und vermindert folglich auch den Wert des Korrelationskoeffizienten.

Die Analysen zum Sortierungsverhalten des GFP-markierten CD3 ζ -WT zeigten starke Kolokalisierung mit verschiedenen Teilen des TCR und waren daher ein gutes Indiz für dessen natives Vorkommen im TCR in der Plasmamembran.

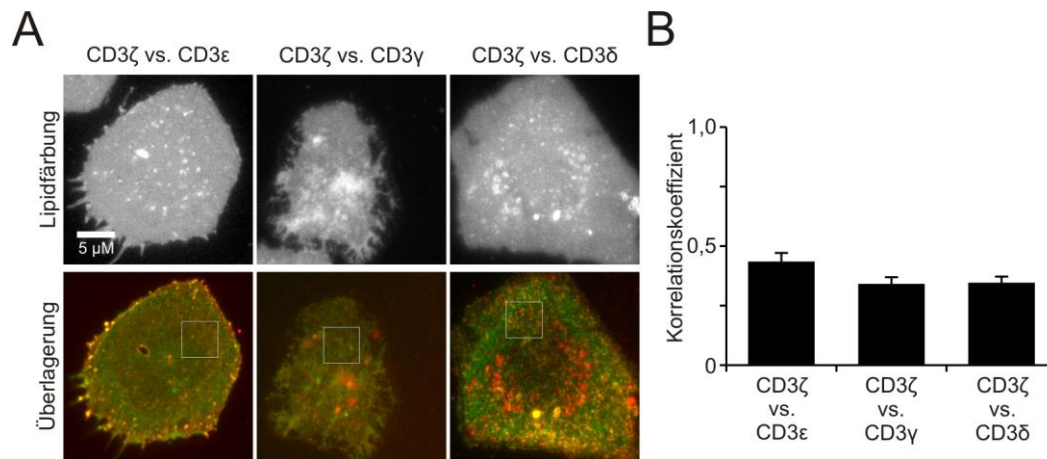


Abbildung 33 Kolokalisierung von CD3 ζ -WT mit anderen Bestandteilen des TCR

Membrane Sheets von doppelt transfizierten Jurkat E6.1-Zellen. CD3 ζ -WT-mEGFP wurde mit mRFP-markierten Fusionsproteinen von CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ koexprimiert. Für die Signale aus den ausgewählten Ausschnitten (ROIs) (weiße Kästen) (A) wurde jeweils der Pearsons Korrelationskoeffizient (B) berechnet. CD3 ϵ korrelierte mit 0,43 fast gleich stark, wie CD3 ζ mit CD3 ζ ($\sim 0,5$) (Abbildung 35, linker Balken (B)). CD3 γ und CD3 δ wiesen mit 0,34 bzw. 0,35 geringere Korrelationen auf (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 2-14, SEM).

Clusterverhalten von CD3 ζ mit deletierten intrazellulären Domänen

Es war festgestellt worden, dass GFP-markiertes CD3 ζ in die Cluster des endogenen TCR der Plasmamembran sortiert wird (Abbildung 33). Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl die Wildtypvariante, als auch die CD3 ζ -ITAM-Deletionsmutanten als Dimere in den Zellen vorkommen (Abbildung 32). Als nächstes sollte die Lokalisierung und das Verhalten der CD3 ζ -Varianten in der Plasmamembran und innerhalb der Zelle untersucht

werden, mit dem Ziel mögliche Unterschiede zwischen CD3 ζ -ITAM-Mutanten und dem Wildtypprotein herauszuarbeiten (Abbildung 34).

Es wurden aus den, mit den verschiedenen CD3 ζ -Varianten, transfizierten Zellen *Membrane Sheets* hergestellt. In ihrer Verteilung zeigten die Deletionsmutanten keine offensichtliche Unterschiede zum Wildtypprotein (Abbildung 34A). Um diesen Eindruck quantitativ zu bestätigen wurde die Clustergradanalyse (siehe Kapitel 4.2.17, S. 77) für CD3 ζ -WT-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP, dem kürzesten Vertreter der Deletionsmutanten, durchgeführt (Abbildung 34B). Diese bestätigte den visuellen Eindruck und wies ebenfalls keine Unterschiede im Clustergrad von Mutante und Wildtyp auf. (Für Abbildung 34B wurden die für Abbildung 41B und D gezeigten Werte vorab dargestellt.)

Die intrazelluläre Verteilung von CD3 ζ -WT-mEGFP und CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP wurde durch konfokale Mikroskopie mit anschließender 3D-Rekonstruktion der Zellen verglichen (Abbildung 34B). Bei den mit CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP transfizierten Zellen waren speichenartige intrazelluläre Strukturen zu sehen und fast keine Färbung der Lamellopodien. CD3 ζ -WT-mEGFP hingegen kam nur in einem geringen Teil intrazellulär in einem zentralen vesikulärem Zentrum vor und war größtenteils membranständig.

Der einzige deutliche Unterschied war somit eine erhöhte intrazelluläre speichenartige Lokalisierung durch Deletion der ITAM-Domänen.

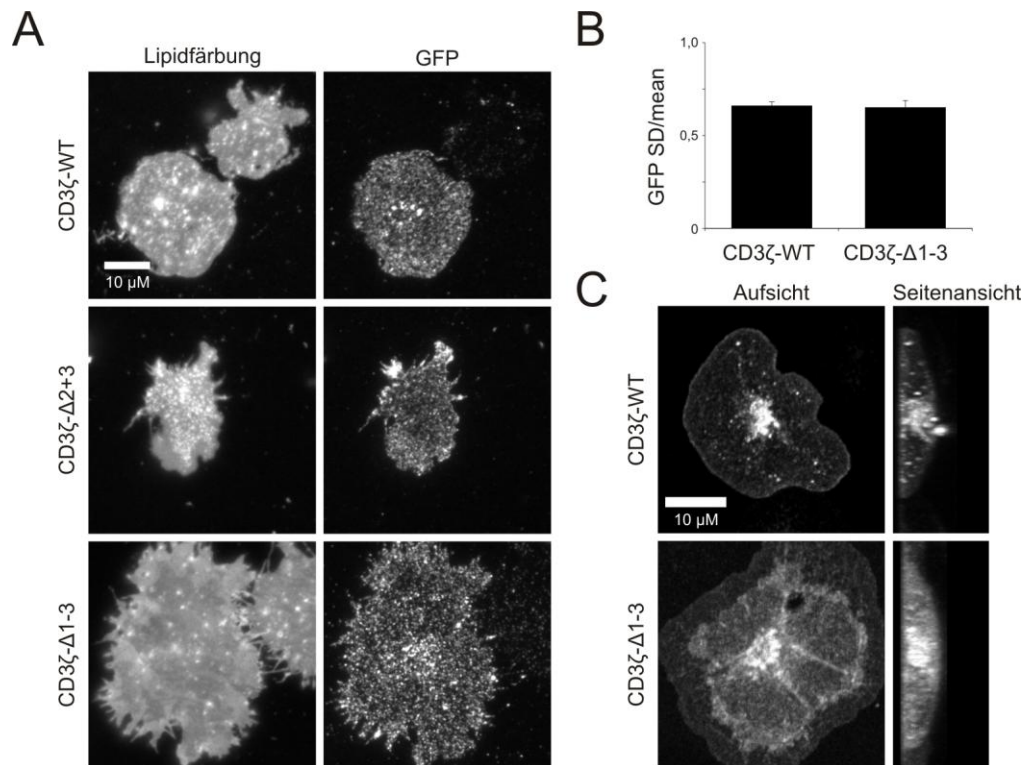


Abbildung 34 Clustern und Lokalisierung von CD3ζ und dessen Deletionsmutanten in Jurkat E6.1 T-Zellen

(A) *Membrane Sheets* von transfizierten Jurkat E6.1-Zellen. Die Membranintegrität wurde mit Hilfe des lipophilen Farbstoffes TMA-DPH gezeigt. Die geclusterte Verteilung von CD3ζ-WT und den Mutanten in der Membran war nicht zu unterscheiden. **(B)** Clustergradanalyse von CD3ζ-WT und CD3ζ-ΔITAM1-3-mEGFP in Jurkat E6.1 *Membrane Sheets*. Zwischen Wildtypprotein und Deletionsmutante ohne ITAM-Motive konnte kein Unterschied im Clustergrad festgestellt werden (Experimente n = 3-5, ROIs pro Experiment n = 22-37, SEM). **(C)** Vergleich der 3D-Rekonstruktion konfokaler Mikroskopie. CD3ζ-ΔITAM1-3-mEGFP war im Vergleich zum Wildtypkonstrukt zusätzlich in intrazellulären speichenartigen Strukturen lokalisiert.

Demnach kommen sowohl CD3ζ-WT als auch CD3ζ-ΔITAM1-3 in der Plasmamembran in zumindest ähnlich erscheinenden Clustern vor.

Ungeklärt war jedoch die Frage, ob diese Cluster äquivalente biologische Strukturen sind oder nur ähnlich erscheinen. Um diese Frage zu klären wurde erneut eine Koloalisierungsanalyse per Pearsons Korrelation durchgeführt (ähnlich wie für Abbildung 33).

Dazu wurden Jurkat E6.1-Zellen doppelt mit CD3ζ-Varianten transfiziert, die an unterschiedliche Fluorophore gekoppelt waren. CD3ζ-WT wurde als GFP-

oder RFP-Variante jeweils mit der gegensätzlich-gekoppelten Variante von sich selbst oder von CD3 ζ - Δ ITAM1-3 verglichen. Die eigentliche Analyse wurde wie bei der Überprüfung der Sortierung von CD3 ζ -WT-mEGFP in den membranständigen TCR (S. 108) durchgeführt.

Dabei diene die Doppeltransfektion CD3 ζ -WT-mEGFP/CD3 ζ -WT-mRFP als Positivkontrolle, bei der beide Proteine in identischen Clustern gemischt vorliegen sollten. Der dafür berechnete Wert des Pearsons Korrelationskoeffizient zeigte den maximal erreichbaren Wert des Testsystems an (siehe Abbildung 35B, linker Balken). Wenn der Korrelationskoeffizient von CD3 ζ - Δ ITAM1-3 mit CD3 ζ -WT einen vergleichbar hohen Wert einnehmen würde wie die Korrelation zwischen den Wildtypproteinen, könnte davon ausgegangen werden, dass sich die ITAM-Mutante in äquivalenten TCR-Clusterstrukturen in der Plasmamembran befindet.

Es bestand die Möglichkeit, dass durch unterschiedliche Eigenschaften der Fluorophore die Lokalisierung der zu untersuchenden CD3 ζ - Δ ITAM1-3-Variante beeinflusst würde. Beispielweise wäre eine unterschiedliche Tendenz der Fluorophore zu oligomerisieren denkbar. Dadurch wäre je nach Kombination der Fluorophore mit den CD3 ζ -Varianten mit unterschiedlichen Korrelationswerten zu rechnen. Aus diesem Grund wurde sowohl für CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP/CD3 ζ -WT-mRFP als auch CD3 ζ -WT-mEGFP/CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mRFP korreliert.

In den Überlagerungen waren viele geclusterte Bereiche gelb gefärbt (repräsentative Aufnahmen in Abbildung 35A, mitte und rechts). Dies deutete auf eine starke Kolokalisierung der CD3 ζ - Δ ITAM1-3-Deletionsmutante mit CD3 ζ -WT hin. Mit einem gemessenen Wert von jeweils $\sim 0,5$ waren die Korrelationskoeffizienten für alle Kombinationen von CD3 ζ -WT mit sich selber oder der Deletionsmutante als sehr starke Kolokalisierung einzustufen (Abbildung 35B), wie weiter oben erklärt (siehe S. 108).

Zusammenfassend sprachen die Ergebnisse der Korrelationsanalysen für die ITAM-unabhängige Sortierung von CD3 ζ in die nativen TCR-Cluster der Plasmamembran.

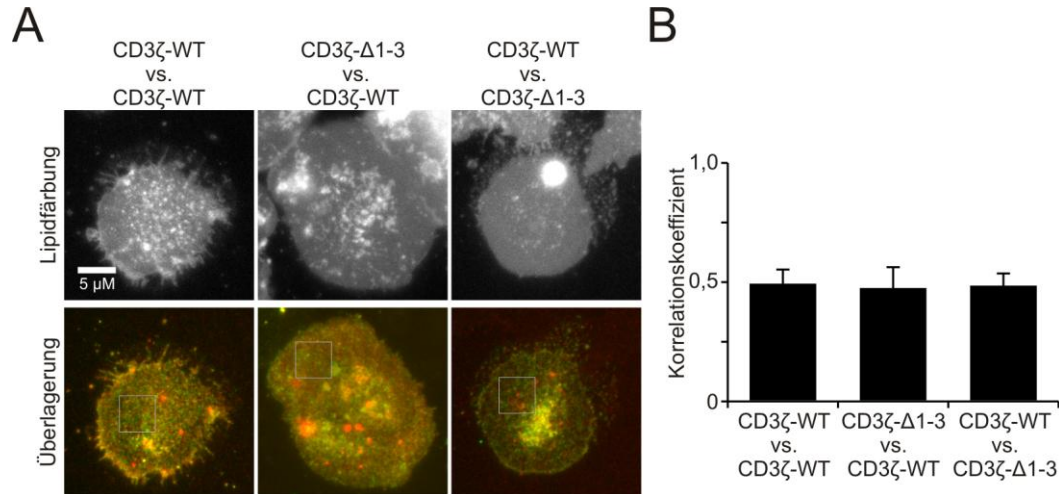


Abbildung 35 Kolokalisierung von CD3 ζ -WT mit Deletionsmutanten

Membrane Sheets von doppelt transfizierten Jurkat E6.1-Zellen. Die überexprimierten Proteine waren mit mEGFP (jeweils obere Komponente der Beschriftung) und mRFP (jeweils obere Komponente der Beschriftung) fusioniert. In den ausgewählten Ausschnitten (ROIs) (weiße Kästen) wurde jeweils der Pearsons Korrelationskoeffizient (siehe B) berechnet. **(A und B)** Die Verteilung des CD3 ζ -Wildtypproteins wurde mit der des ITAM-defizienten CD3 ζ verglichen. Um auszuschließen, dass die Kombination der angehängten fluoreszierenden Proteine einen Einfluss auf die Kolokalisierung hatte, wurde bei dem Paar CD3 ζ -WT/CD3 ζ -ΔITAM1-3 beide möglichen Kombinationen geprüft. Die Korrelationswerte für Wildtyp/Wildtyp und Wildtyp/Mutante hatten beide einen Wert von ~0,5 (Experimente n = 5, ROIs pro Experiment = 3-26, SEM).

5.2.2 Einfluss von Ca²⁺ auf das Clustern des TCR in der Plasmamembran von T-Zellen unterschiedlicher Aktivierungszustände

In der Literatur sind unterschiedliche Einflüsse von Ca²⁺ auf Membranproteine beschrieben worden. Generell steigt der Clustergrad negativ geladener Membranproteine über Ca²⁺-induzierte elektrostatische Wechselwirkungen an (Zilly *et al.* 2011). Beim TCR ist bekannt, dass durch die Einwirkung von lokalem Ca²⁺ die Phosphorylierung der ITAM-Motive durch die Lck-Kinase erhöht und im Laufe dieses Prozesses die

intrazellulären Teile von CD3 ζ von der Plasmamembran abdissoziieren (Shi *et al.* 2013). Da bei der T-Zell-Aktivierung Ca²⁺ freigesetzt wird und sich lokal anreichert (Shi *et al.* 2013) könnte es auch einen direkten Einfluss auf die TCR-Organisation haben.

Um diesen möglichen Einfluss zu untersuchen, wurden *Membrane Sheets* von mit CD3 ζ -WT und CD3 ζ - Δ ITAM1-3 transfizierten T-Zellen in Puffer mit 54 μ M Ca²⁺ oder ohne Ca²⁺ bei 37 °C 30 min inkubiert (siehe Kapitel 4.2.5). Um den Ca²⁺-Einfluss in Kombination mit angeschalteten intrazellulären Signalwegen zu untersuchen, wurden die T-Zellen vor der *Membrane Sheet*-Präparation auf Deckgläsern adhäriert, die mit aktivierendem Antikörper beschichtet worden waren. Durch eine Clustergradanalyse wurden Ca²⁺-Effekte auf die CD3 ζ -Varianten CD3 ζ -WT und CD3 ζ - Δ ITAM1-3 in den *Membrane Sheets* von nicht-aktivierten oder aktivierten Zellen quantifiziert (Abbildung 36B und D).

Sowohl CD3 ζ -WT (Abbildung 36A) als auch CD3 ζ - Δ ITAM1-3 (Abbildung 36B) zeigten auf den aktivierend-wirkenden Deckgläsern Mikrocluster und teilweise zentralisierte, mikroclusterartige Strukturen des TCR. Durch bloße Betrachtung war bei erhöhtem Ca²⁺-Level sowohl in aktivierten als auch in nicht-aktivierten *Membrane Sheets* kein Unterschied des CD3 ζ -Clusterns zu erkennen.

In der quantitativen Darstellung des Ca²⁺-Einflusses auf CD3 ζ -WT war keine Veränderung des Clustergrades zwischen Ca²⁺-behandelten und unbehandelten *Membrane Sheets* sichtbar, lediglich eine leichte Tendenz hin zu stärkerem Clustern fiel auf. In *Membrane Sheets* von aktivierten Zellen war der Clustergrad durch Mikroclusterbildung leicht erhöht und Ca²⁺ hatte keinen weiteren Anstieg zur Folge (Abbildung 36B, Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 21-31, SEM).

Die Experimente und Analysen wurden auch für die Deletionsmutante CD3 ζ - Δ ITAM1-3 durchgeführt, um den Einfluss fehlender ITAM-Domänen bei der

Reorganisation während der Stimulation zu untersuchen. Ebenso wie beim CD3 ζ -Wildtypprotein war für CD3 ζ - Δ ITAM1-3 durch Ca²⁺-Inkubation bei visueller Betrachtung keine Veränderung im Verteilungsmuster detektierbar (Abbildung 36C). Es waren ebenfalls die für TCR-Aktivierung charakteristischen Mikrocluster und eine zentralisierte Ausrichtung von CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP zu beobachten. Die korrespondierende Clustergradanalyse in Abbildung 36D (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 22-27, SEM) zeigte erneut einen geringen Unterschied zwischen aktivierten und nicht-aktivierten Zellen. Ca²⁺-Inkubation hatte im Falle der aktivierten Zellen keinerlei Einfluss auf den Clustergrad des TCR der Plasmamembran und in *Membrane Sheets* inaktiver Zellen einen vernachlässigbar kleinen Absinken des Clustergrades zur Folge.

Zusammenfassend hatte die Clustergradanalyse keinen Einfluss von Ca²⁺ auf die Verteilung von CD3 ζ -WT gezeigt, nur eine leichte Tendenz zu einem höheren Clustergrad deren Relevanz aufgrund der großen Schwankungsbreite der Ergebnisse als unbedeutend eingeschätzt werden musste. Die Deletionsmutante CD3 ζ - Δ ITAM1-3 wurde in ihrer Verteilung von Ca²⁺ keiner überprüfbaren Weise beeinflusst. Jedoch war für beide Proteinvarianten morphologisch ein Unterschied des Clustergrades zwischen aktivierten und nicht-aktivierten Zellen erkennbar, der auch durch eine leichte Erhöhung des ermittelten Clustergrades wiedergegeben wurde (Abbildung 36).

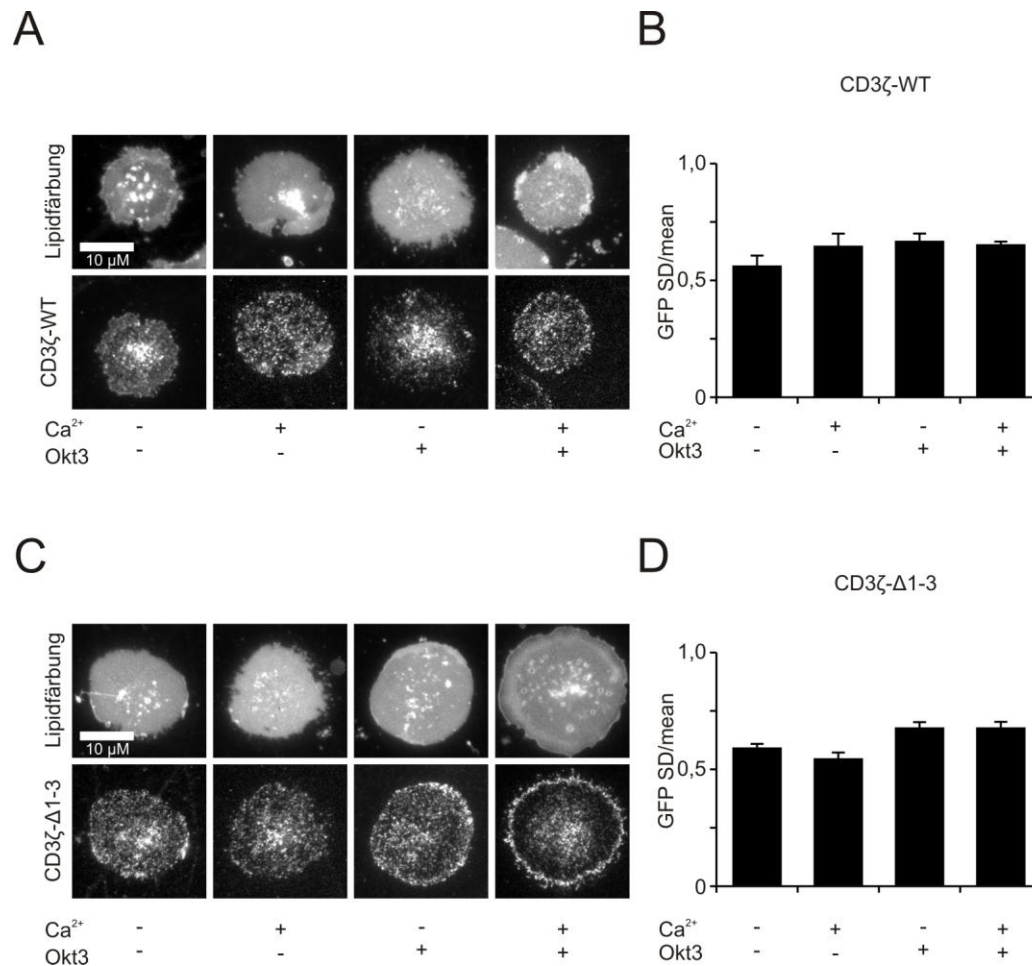


Abbildung 36 Ca²⁺ hat keinen Einfluss auf das Clustern von CD3 ζ in der Plasmamembran von aktivierten und naiven Jurkat-Zellen

(A) PLL-beschichtete Deckgläser oder aktivierende Deckgläser (zusätzlich mit Okt3 beschichtet) wurden mit CD3 ζ -WT-mEGFP transfizierten Jurkat E6.1-Zellen inkubiert. Nach Anheftung der Zellen wurden *Membrane Sheets* hergestellt und mit K-Glu mit/ohne 54 μ M Ca²⁺ für 30 min inkubiert. Danach wurde mit PFA fixiert. **(B)** Die Membran wurde mit TMA-DPH gefärbt und in dem Kanal Ausschnitte (ROIs) gewählt, in denen im GFP-Kanal eine Clustergradanalyse durchgeführt wurde (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 21-31, SEM). Zwischen nicht-aktivierten und aktivierten Membranen konnte ein leichter Anstieg des Clusters beobachtet werden.

(C) Es wurde experimentell wie in (A) vorgegangen, jedoch die ITAM-defiziente Deletionsmutante CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP untersucht. **(D)** Methode siehe (B) (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 22-27, SEM). Ca²⁺ hatte keinen Einfluss, die Aktivierung der Zellen führte zu leicht erhöhtem Clustern.

5.3 Rolle von Glykolipiden bei dem Clusterverhalten des TCR

Es ist interessant zu untersuchen, wie sich die Lipide auf das Clustern des TCR auswirken, da z. B. die Transmembrandomäne von CD3 ζ wichtig für die Größe von Nanoclustern ist (Kumar *et al.* 2011). Außerdem wurde beschrieben, dass die Reduktion von Glykosphingolipiden in T-Zellen zu verminderter Aktivierung führt (Zhu *et al.* 2011) und dass der TCR mit GM1 assoziiert ist (Thomas *et al.* 2003). Aus diesen Gründen ist eine Verbindung der Glykolipidzusammensetzung der Plasmamembran mit dem TCR-Clustern wahrscheinlich. Zur Untersuchung der genauen Bedeutung wurden daher die Glykolipidlevel nativer Membranen mit Hilfe von GLTP, einem lipitransferierenden Protein, verändert und die Effekte auf das TCR-Clustern beobachtet.

5.3.1 Das Lipidtransferprotein GLTP

Lipidtransferproteine (LTPs), wie das GLTP, können Lipide bei Inhibition des vesikulären Systems transportieren (Halter *et al.* 2007; Lev 2010). Grundsätzlich werden die LTPs nach den Lipidklassen in drei Kategorien eingeteilt: Phospholipid-, Sphingolipid- und Cholesteroltransferproteine (Lev 2010). Der direkte Transfer von Lipiden wurde hauptsächlich in *in vitro*-Systemen mit artifiziellen Membranen gezeigt (Helmkamp, JR 1986; Carton *et al.* 2010). Dabei findet ein Nettotransfer von Lipiden statt, der entlang des Lipidkonzentrationsgradienten verläuft und zusätzlich sowohl durch Lipidkomposition als auch Membrankrümmung beeinflusst wird (Lev 2010).

In *in-vivo*-Experimenten konnte nur für wenige LTPs ein vektorieller Transport nachgewiesen werden (Milligan *et al.* 1997; Hanada *et al.* 2003), weshalb auch die Funktion als Lipidsensor (Tuuf & Mattjus 2007; Kang *et al.* 2010) oder als kontrollierende Instanz für andere lipidbindende Proteine diskutiert wird.

Auf Grund der *in vitro* gezeigten generellen Fähigkeit Lipide zu transferieren stellen die LTPs eine mögliche Alternative zu Chemikalien wie Cyclodextrinen dar (Lauria *et al.* 2013).

GLTP sollte daher in dieser Weise als biochemisches Werkzeug eingesetzt werden um *in vitro* den Glykolipidspiegel in T-Zellen zu verändern. Als Negativkontrolle wurden Punktmutanten generiert, deren Membran- oder Glykolipidbindung beeinträchtigt sind (siehe Methoden S. 57).

Humanes GLTP ist in seiner endogenen Form ein aus 209 Aminosäuren (23,9 kDa) bestehendes, zytosolisches Protein ohne Glykosylierungen oder Disulfidbrücken. In einer schematischen Darstellung (Abbildung 37A) wurden seine beiden *tandem repeats* der Glykolipidbindungsstelle wie auch die Aminosäuren W96 (Trp96) und W142 (Trp142), die in den Mutanten verändert wurden, indiziert.

Das Wildtypprotein (GLTP-WT) und die Mutanten GLTP-W96A und GLTP-W142A wurden nach Expression in *E. coli* über eine His-Sequenz aufgereinigt, die in einer N-terminal angehängten Aminosäureabfolge NH₂-MGSS-6xHis-SSG-Thrombinschnittstelle-H enthalten war. Dadurch hatten die aufgereinigten GLTP-Varianten 229 Aminosäuren und sollten eine Größe von 26 kDa haben.

Die einzelnen Aufreinigungsschritte wurden mit *coomassie*-blau-gefärbten Polyacrylamid-Gelen nachvollzogen (Abbildung 37C) und die genaue Identität der Proteine per *Western Blot* nachgewiesen (Abbildung 37B).

Bei den *coomassie*-gefärbten SDS-PAGEs der Proteinaufreinigungen wurde pro Probe jeweils der gleiche Anteil des Ausgangsvolumens (1:5333) eingesetzt, so dass die Proben untereinander quantitativ vergleichbar waren (Abbildung 37C). Die Proben wurden von links nach rechts wie folgt aufgetragen: Proteinstandard zur Massenbestimmung, Pellet des Lysats exprimierender Bakterien (P), Überstand der lysierten Bakterien (ÜS),

Durchfluss nach Ni-NTA-Agarosebindung (DF), Durchfluss des Waschpuffer 1 (W_1), Proben der einmal gewaschenen Ni-NTA-Agarose (B), Durchfluss des Waschpuffer 2 (W_2), Eluat (E) und dreifache Menge an Eluat ($3xE$). Eine Probe des dritten Waschschriffs wurde aus Platzgründen für die Abbildung 37C nicht aufgetragen, aber in Probeentnahmen anderer Aufreinigungen war kein GLTP während dieses Schrittes detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Die rekombinanten Proteine konnten aus dem Bakterienlysat ohne große Verunreinigungen aufgereinigt und konzentriert werden, wie aus den Banden bei 24 bis 25 kDa der Eluat-Reihen ersichtlich war. GLTP hätte wie oben beschrieben eine erwartete Größe von 26 kDa gehabt. Die Abweichung resultierte wahrscheinlich aus durch die Aminosäurezusammensetzung veränderten Migrationseigenschaften oder unregelmäßig aufgetrenntem Marker. In den Reihen der Eluate und der konzentrierten Eluate waren zusätzlich zu den Banden der rekombinanten Proteine nur schwache weitere Banden bei ~80 kDa zu sehen, die wahrscheinlich von histidinreichen *Heat shock*-Proteinen aus den *E. coli* stammten. Die Reinheit der hergestellten Proteine war ausreichend für anwendungsorientierte Assays.

Zum spezifischen Identitätsnachweis wurde mit den Eluaten der hergestellten Proteine eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen das 6xHis- und gegen ein GLTP-Epitop durchgeführt (Abbildung 37B). In den SDS-PAGEs wurden gleiche Mengen an gereinigtem Protein nebeneinander aufgetragen. Jeweils von links nach rechts: GLTP-WT, GLTP-W96A und GLTP-W142A. Das in den *Coomassie* Gelen beobachtete Signal bei 25 kDa war sowohl mit dem Antikörper gegen den His-tag, wie auch mit dem gegen die endogene Domäne des Proteins, bei allen Proben der Punktmutanten und des WT-Proteins erkennbar. Weitere Banden zwischen 70 kDa und 100 kDa stammten wahrscheinlich von Proteinen aus *E. coli*, welche unspezifisch an die Ni-NTA Agarose gebunden hatten.

Zusammenfassend konnte mit den Experimenten nachgewiesen werden, dass GLTP als Wildtypprotein und in den mutierten Formen mit *E. coli* als prokaryotischem Expressionssystem in verwendbarer Reinheit hergestellt und konzentriert werden konnte.

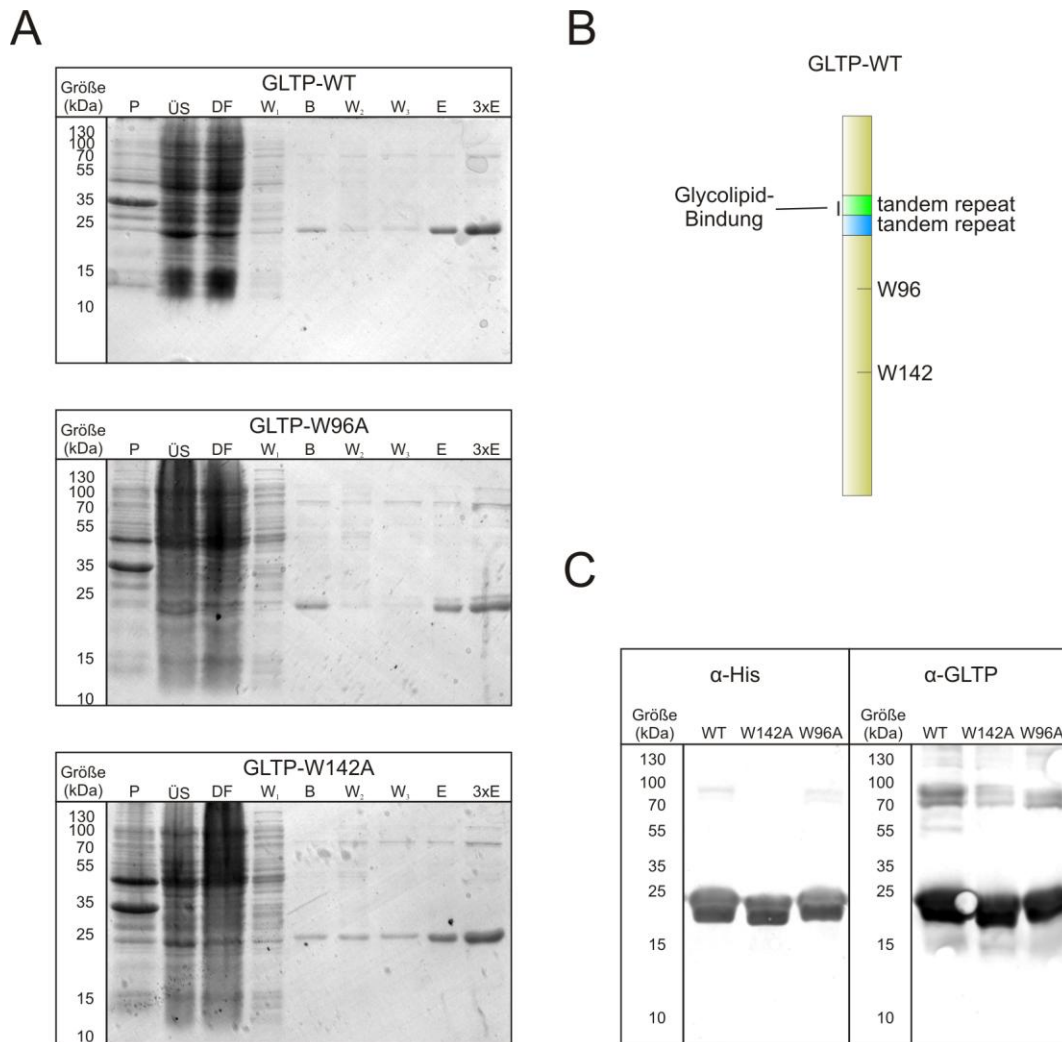


Abbildung 37 Aufreinigung des Lipidtransferproteins (LTP) GLTP

(A) Coomassie PAGEs von GLTP-Wildtyp und den Mutanten (P; Pellet, ÜS; Überstand, DF; Durchfluss, W₁; Waschschrift 1, B; Beads, W₂; Waschschrift 2, W₃; Waschschrift 3, E; Eluat, 3xE; dreifache Menge an Eluat). Es wurde pro Geltasche ein Anteil von 1:5333 vom Ausgangsvolumen eingesetzt. Die Gele zeigten, dass die rekombinanten Proteine (bei ~25 kDa) aufgereinigt und konzentriert werden konnten. **(B)** Schema von GLTP. GLTP besteht aus 209 AS, hat eine Größe von 23,9 kDa und enthält zwei *tandem repeats*, die eine Glykolipidbindestelle beinhalten. Die Aminosäuren W96 und W142 sind wichtig für den Transport von Glykolipiden und die Membranbindung. Die hier verwendeten Konstrukte enthielten N-terminal ein 6x His-Tag und eine Thrombin-Schnittstellensequenz verbunden durch Linker-sequenzen. Sie bestanden daher aus 229 AS und hatten eine erwartete Größe

von 26 kDa. **(C)** *Western Blot* von gereinigtem, GLTP-WT und den GLTP-Mutanten W142A und W96A, jeweils mit 6x His-Tag markiert. Sowohl α His als auch α GLTP detektierten Wildtypprotein und Mutanten bei ~25 kDa.

Nach Überprüfung der Identität und des Reinheitsgrades der aufgereinigten GLTP-Varianten wurde die Funktionalität der Proteine als LTPs demonstriert. Als Erstes wurden die Glykolipidbeladung und die –depletion gezeigt (Abbildung 38) und anschließend der Glykolipidtransport zwischen nativen Plasmamembranen untersucht (Abbildung 39).

Für die Beladungsexperimente wurde GLTP mit GM1-enthaltenden Liposomen 20 min bei 37 °C präinkubiert und mit dieser Suspension HepG2-*Membrane Sheets* 10 min bei 37 °C inkubiert (Methode siehe Kapitel 4.2.8). Zur Visualisierung von GM1, als Stellvertreter für andere Glykolipide, wurde eine Cholera-toxin B-Färbung (siehe Methoden 4.2.6) verwendet und abschließend die *Membrane Sheets* fixiert.

Bei dieser Beladung nativer HepG2-Plasmamembranen konnte das bis zu 43-fache des endogenen GM1-Levels erreicht werden (bei 25 μ M, Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um die unspezifische Bindung der Liposomen an die *Membrane Sheets* handelte oder um spontanen Lipidaustausch, wurden als Kontrolle in ihrer Funktion beeinträchtigte GLTP-Mutanten eingesetzt. Die relativen Transfereffizienzen von GLTP-W96A, GLTP-W142A und GLTP-WT wurden anhand der GM1-Insertion in *Membrane Sheets* verglichen (Abbildung 38A). Die GM1-Beladung der *Membrane Sheets* durch die GLTP-Mutanten W96A und W142A war im Vergleich zum Wildtyp-GLTP vor allem bei niedrigen Proteinkonzentrationen beeinträchtigt. Bei höheren Konzentrationen war die Beladungseffizienz teilweise wiederhergestellt (siehe W142A, 25 μ M) (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 28-98, SEM). (Die Abbildung wurde verändert aus Lauria *et al.* 2013 übernommen.)

Ursache dieses Effekts war wahrscheinlich, dass die GM1-Sättigung der Akzeptormembran schon durch geringe Konzentrationen des Wildtypproteins

(1 μM) erreicht wurde. Allerdings limitierte diese begrenzende maximale Lipidkonzentration die weniger effizient agierenden mutierten Formen erst bei sehr viel höheren Proteinkonzentrationen (Die Mutante GLTP-W142A erreichte bei 25 μM 100 % Beladung).

Stellvertretend für die unterschiedlichen Beladungseffizienzen der GLTP-Mutanten wurden in Abbildung 38F beladene *Membrane Sheets* der Bedingung „1 μM GLTP“ gezeigt. Die *Membrane Sheets* unterschieden sich bei Behandlung mit unterschiedlichen GLTP-Varianten nicht in der Lipidfärbung. Die CTX-Fluoreszenzfärbung wies hingegen deutliche Unterschiede auf. Und es konnte nur bei Inkubation mit GLTP-WT mit bloßem Auge eine GM1-Beladung der *Membrane Sheets* erkannt werden.

Im Anschluss an die Beladungsexperimente mit GM1 wurde die Depletionsfähigkeit von GLTP in nativen Plasmamembranen überprüft. Dazu wurden *Membrane Sheets* von Jurkat E6.1- und PC12-Zellen verwendet (Abbildung 38C-F).

Membrane Sheets aus Jurkat E6.1-Zellen wiesen endogen eine sehr hohe mittlere GM1-Konzentration auf (74-fach höher als HepG2, siehe Abbildung 39C) und waren daher geeignet um Depletionseffekte über eine große Konzentrationsspanne zu beobachten. (Die GM1-Konzentration in den unterschiedlichen *Membrane Sheets* der Jurkat E6.1-Population variierten sehr stark, wie auf dem linken Bild der CTX-Färbung der Abbildung 38D zu sehen ist, und wurde sich in weiteren Untersuchungen zu Nutze gemacht (siehe Abbildung 39).)

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der GLTP-vermittelten GM1-Depletion wurden daher Jurkat E6.1-*Membrane Sheets* mit steigenden Konzentrationen an GLTP-WT 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit CTX-AlexaFluor®594 gefärbt und fixiert (Methode siehe Kapitel 4.2.7). Die Intensitäten der behandelten *Membrane Sheets* wurden gemessen und die

gemittelte CTX-Intensität der Kontrollbedingung zur Normalisierung der Werte verwendet (Abbildung 38C, verändert übernommen aus Lauria *et al.* 2013)(Experimente $n = 3-5$, ROIs pro Experiment = 142-316, SEM, enthält Daten aus Abbildung 39A).

Das Experiment ergab, dass GLTP-WT konzentrationsabhängig bis über 95 % des GM1 aus nativen Jurkat E6.1-Plasmamembranpräparationen depletierte.

Die Integrität der *Membrane Sheets* blieb auch bei hohen GLTP-Konzentration (50 μM) erhalten, wie aus der exemplarische Darstellung von Lipid- und CTX-gefärbten *Membrane Sheets* in Abbildung 38D ersichtlich ist. Jedoch waren bei der höchsten GLTP-Konzentration von 50 μM im Umfeld der *Membrane Sheets* Lipidablagerungen zu erkennen (rechtes Bild, obere Reihe als kleine Punkte erkennbar). Um eine visuelle Vergleichbarkeit der GM1-Level der *Membrane Sheets* aus C zu ermöglichen wurde die untere Bildreihe identisch skaliert. Die unbehandelten *Membrane Sheets* zeigten, wie oben beschrieben, eine starke Variation der CTX-Färbung, wodurch einzelne *Membrane Sheets* nur saturiert dargestellt werden konnten (linkes Bild untere Reihe). Im Vergleich zu dieser Kontrollbedingung waren die Fluoreszenzintensitäten der *Membrane Sheets* in GLTP-behandelten Zellen teilweise so stark reduziert, dass man nur bei Blick auf die Lipidfärbung die vorhandenen *Membrane Sheets* erkannte (Abbildung 38D, untere Reihe, rechtes Bild).

Nachdem die Konzentrationsabhängigkeit der Glykolipiddepletion durch GLTP überprüft worden war, wurde mittels PC12-*Membrane Sheets* untersucht, ob die Depletion zeitabhängig war und ob sie unabhängig vom Zelltyp funktionierte (Abbildung 38E, F) (Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 69-143, SEM).

Dafür wurden PC12-*Membrane Sheets* mit 50 μM GLTP für verschiedene Zeiten inkubiert und anschließend wie für C gefärbt und fixiert. Bereits nach 5 min waren schon über 80 % des detektierbaren GM1 aus den Membranen entfernt worden. Nach 10 Minuten enthielten die *Membrane Sheets* noch 12,5 % und nach 30 min nur 7,4 % der GM1-Menge der Kontrollbedingung.

Die Abbildung 38F zeigt in gleicher Weise wie D die *Membrane Sheets* der in E verwendeten PC12-Zellen. Die Integrität der *Membrane Sheets* blieb auch nach 30 min erhalten, wie schon aus D zu erwarten gewesen war. Die CTX-Färbung hatte schon nach 5 min GLTP-Inkubation so weit abgenommen, dass bei gleicher Skalierung der Bilder mit der Kontrollbedingung keine CTX-Fluoreszenz mehr sichtbar war.

Aus den visuellen Beobachtungen (Abbildung 38D, F) wie auch aus den Quantifizierungen (Abbildung 38C, E) der Depletionsstudien wurde klar, dass GLTP-vermittelte Glykolipiddepletion aus nativen Membranen nicht zelltypspezifisch, aber konzentrations- und zeitabhängig war.

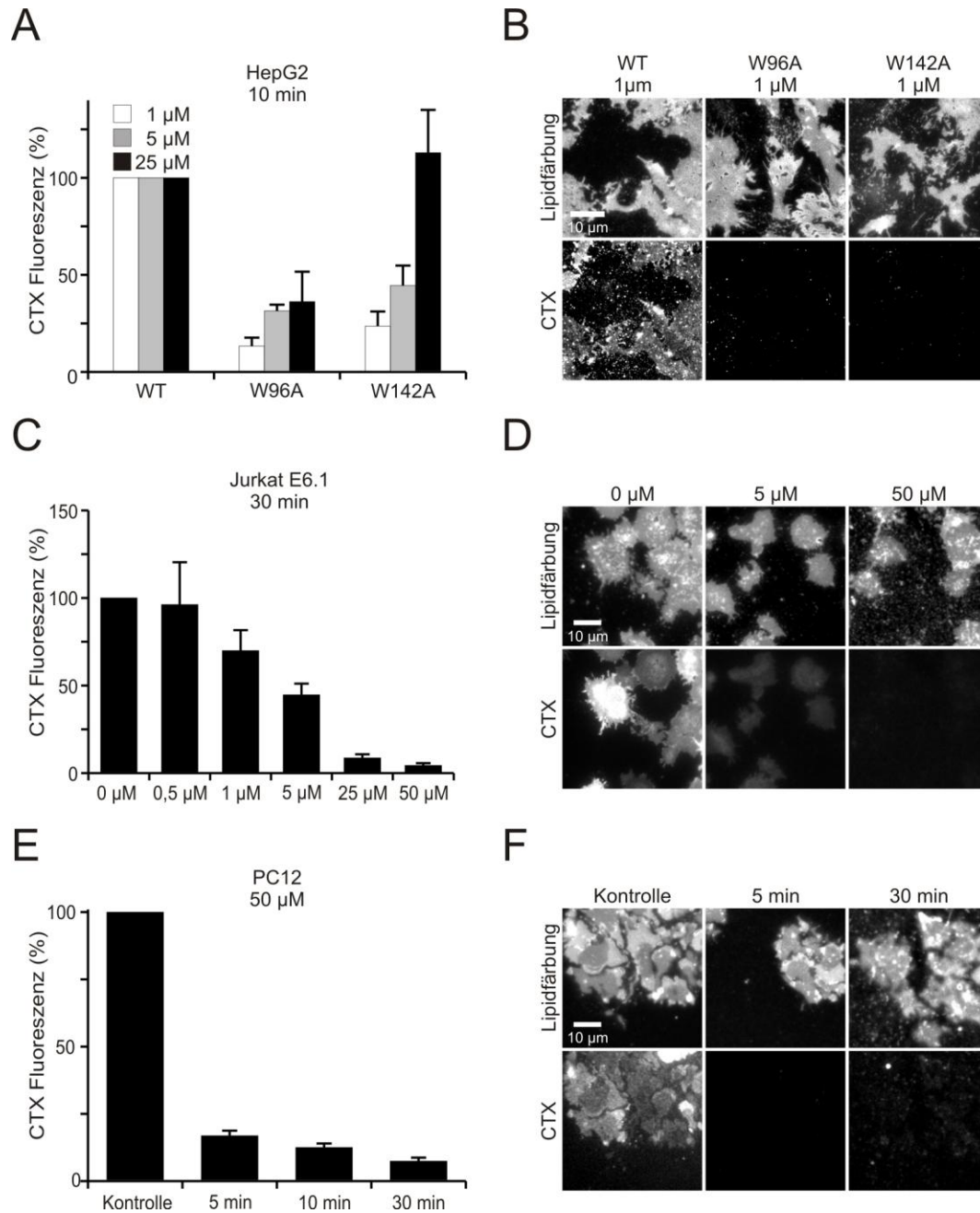


Abbildung 38 GLTP kann Glykolipide in native Membranen spezifisch inserieren und sowohl aus artifiziellen wie auch aus nativen Membranen zeit- und konzentrationsabhängig depletieren

(A) Beladung von HepG2 *Membrane Sheets* mit GM1 10 min bei 37 °C durch GLTP und Mutanten in unterschiedlichen Konzentrationen. GLTP wurde vorher 20 min bei 37 °C mit GM1-enthaltenden Liposomen vorinkubiert (Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 28-98, SEM). Die Beladung von *Membrane Sheets* funktionierte bis zum 43-fachen (nicht gezeigt) des endogenen GM1-Level und wurde durch die Punktmutanten W96A und W142A inhibiert. (Abbildung entnommen und verändert aus Lauria *et al.* 2013) **(B)**

Ausschnitt eines Bildes repräsentativer *Membrane Sheets* aus (E). Identische Skalierung der Grauwerte im CTX-Kanal.

(C) GM1-Depletion durch GLTP in Jurkat E6.1-*Membrane Sheets*. *Membrane Sheets* wurden mit steigenden GLTP-Konzentrationen 30 min bei 37 °C inkubiert und der GM1-Gehalt mit Hilfe von fluoreszierendem Choleratoxin B (CTX) bestimmt (Experimente n = 3-5, ROIs pro Experiment = 142-316, SEM, enthält Daten aus Abbildung 39A). Die GM1-Depletion war konzentrationsabhängig. (Abbildung entnommen und verändert aus Lauria *et al.* 2013) **(D)** Ausschnitt eines Bildes repräsentativer *Membrane Sheets* aus (C). Identische Skalierung der Grauwerte im CTX-Kanal.

(E) PC12 *Membrane Sheets* wurden für verschiedene Zeiten mit 50 µM GLTP bei 37 °C inkubiert (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 69-143, SEM). GLTP-vermittelte GM1-Depletion war zeitabhängig. **(F)** Ausschnitt eines Bildes repräsentativer *Membrane Sheets* aus (E). Identische Skalierung der Grauwerte im CTX-Kanal.

Um den Mechanismus des GLTP-vermittelten Glykolipidtransports genauer zu betrachten wurden *Membrane Sheets* aus Jurkat E6.1-Zellen zur Hilfe genommen. Wie man in Abbildung 39A sehen kann, wiesen diese sehr unterschiedliche endogene GM1-Gehalte auf (Experimente n = 3-5, ROIs pro Experiment = 142-316, SEM). Im Bild der CTX-Färbung der Kontrolle (0 µM) sah man sowohl extrem helle *Membrane Sheets*, als auch sehr dunkle, die ohne parallele Lipidfärbung nicht zu erkennen gewesen wären. Um diese Varianz in der *Membrane Sheet* Population besser darzustellen, wurde der prozentuale Anteil der *Membrane Sheets* gegen die relative Fluoreszenzintensität in einem Histogramm aufgetragen (wie beschrieben in Kapitel 4.2.17, S. 79). Dafür wurden für die relative CTX-Fluoreszenz Intervalle des 0,1-fachen der mittleren Kontrollintensität gewählt. Diese Darstellungsart wurde auch für *Membrane Sheets*, die mit verschiedenen GLTP-Konzentrationen inkubiert worden waren (enthalten Daten aus Abbildung 38A) verwendet. Im Histogramm der Kontrollbedingung erkennt man gut die breite Intensitätsverteilung der *Membrane Sheets*. Einzelne *Sheets* erreichten das 6,3-fache der durchschnittlichen Intensität. Bei Inkubation mit 1 µM oder 5 µM GLTP-WT sieht man, dass die sehr hellen *Membrane Sheets* weniger geworden waren und die Verteilungsbreite insgesamt geringer wurde. Das bei der Kontrollbedingung bei 0,2 liegende Maximum hat sich bei 5 µM GLTP zu 0,4 verschoben und der Anteil der dunklen *Membrane Sheets* wurde geringer. Bei 25 µM GLTP-WT-Inkubation

verschob sich das Maximum wieder in den Bereich dunklerer Messwerte. Die Abbildung wurde verändert aus Lauria *et al.* 2013 übernommen.

Bei den Bedingungen 1 μM und 5 μM kann die Erhöhung der Populationen bei 0,5 bzw. 0,4 nicht allein durch eine relative Abnahme der anderen Populationen erklärt werden, sondern nur durch eine aktive Erhöhung durch einen Netto-Transport von GM1 aus den hellen *Membrane Sheets* hin zu den Dunklen. Bei Inkubation mit 25 μM GLTP-WT überwog dagegen die Aufnahmekapazität des GLTP, so dass kein Transport erfolgte, sondern das GM1 an das in Lösung befindliche GLTP gebunden blieb und ein Nettoverlust an GM1 in *Membrane Sheets* fand statt.

Um zu überprüfen, ob per GLTP ein Transfer der Glykolipide von einem Zelltyp auf einen anderen möglich ist, wurden die GM1-reichen Jurkat E6.1-Zellen und die GM1-armen HepG2-Zellen in einem Testsystem gemeinsam verwendet.

Die GLTP-Lösungen der Experimente aus Abbildung 39A, die scheinbar einen Teil des GM1 aus Jurkat E6.1-Zellen gebunden hatten, wurden nach Inkubation der Jurkat E6.1-*Membrane Sheets* auf HepG2-*Membrane Sheets* gegeben und anschließend die GM1-Level überprüft (Abbildung 39C, verändert aus Lauria *et al.* 2013)(Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 113-316, SEM). Dazu wurde nach den Inkubationen mit CTX-AlexaFluor®594 gefärbt und fixiert. Jurkat E6.1- und HepG2-*Membrane Sheets* wurden bei gleicher Anregungsintensität und mit 100 ms bzw. 1000 ms Exposition aufgenommen und die Intensitäten quantifiziert. Die Intensitätswerte der HepG2-*Membrane Sheets* wurden durch 10 geteilt, um sie mit denen der Jurkat E6.1 vergleichen zu können (genauer siehe Methoden 4.2.9). Bei Betrachtung der Kontrollbedingung sieht man den starken Intensitätsunterschied (74-fach) zwischen Jurkat E6.1 und HepG2.

Die Inkubation der Jurkat E6.1-*Membrane Sheets* mit GLTP-WT führte zur Bindung des Jurkat E6.1-eigenen GM1 an GLTP-WT und resultierte in der bekannten Depletion (vergleiche Abbildung 38C). Wurde diese GM1-beladene GLTP-WT-Lösung auf die GM1-armen HepG2-*Membrane Sheets* gegeben, kam es dort zu einer GM1-Beladung wie in Abbildung 38A, mit dem Unterschied, dass eine native Plasmamembran als GM1-Donor gedient hatte. Durch das Wechselspiel von GM1-Depletion aus Jurkat E6.1-*Membrane Sheets* und der GM1-Insertion in HepG2-*Membrane Sheets* kam es somit zu einem Netto-Transfer von GM1 von den GM1-reichen zu den GM1-armen Plasmamembranen. Bei ausreichend hoher Konzentration des Transporters (25 μM GLTP-WT) wurde als Resultat dessen ein Status gleicher GM1-Konzentration erreicht. Diese Konzentration stellt daher wahrscheinlich den Punkt da, bei dem ein Gleichgewicht zwischen Assoziations- und Dissoziationspotential von GLTP für GM1 erreicht ist.

Der Prozess des Glykolipid-entladens bzw. -beladens von Jurkat E6.1 bzw. HepG2-*Membrane Sheets* kann gut in Abbildung 39B nachverfolgt werden in der exemplarisch einige *Membrane Sheets* dargestellt sind. Durch die gleiche Skalierung von Bildern desselben Zelltyps kann man die Zu- bzw. Abnahme der CTX-Fluoreszenz und der damit verbundenen Glykolipidlevel nachverfolgen. (Die starken Intensitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen machten eine gleiche Skalierung aller Bilder unmöglich.)

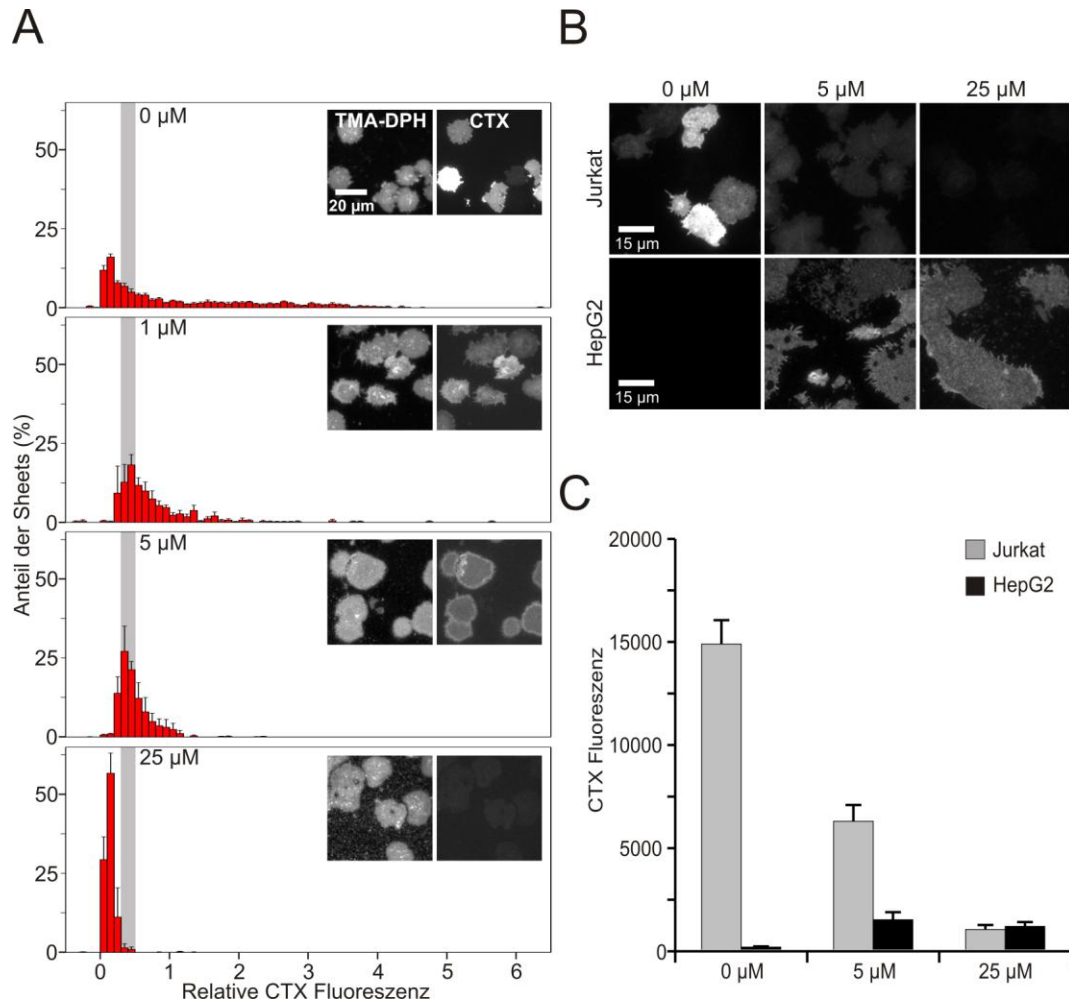


Abbildung 39 GM1-Transport durch GLTP ist abhängig von der GM1-Konzentration der Donor- und Akzeptor-Membran

(A) Jurkat E6.1-Membrane Sheets wurden mit 0 µM bis 25 µM GLTP 30 min bei 37 °C inkubiert. Histogramm der relativen CTX Fluoreszenz (GM1-Gehalt) in der Population (Experimente n = 3-5, ROIs pro Experiment = 142-316, SEM). GLTP tauschte GM1 zwischen Jurkat E6.1-Membrane Sheets aus und bewirkte die Angleichung der GM1-Konzentrationen. (Abbildung verändert aus Lauria *et al.* 2013)

(B) Die obere Reihe zeigt repräsentative Membrane Sheets aus (A) mit gleicher Skalierung der Grauwerte. Die inkubierte Lösung aus (A) mit beladenem GLTP wurden verwendet um HepG2-Membrane Sheets 30 min bei 37 °C zu inkubieren (untere Reihe, einheitliche Skalierung der Grauwerte). Die Beladung von HepG2-Membrane Sheets durch GLTP mit GM1 aus Jurkat E6.1 war möglich.

(C) Quantifizierung des Experiments (B) (siehe 0). Jurkat E6.1- bzw. HepG2-Membrane Sheets wurden für 100 ms bzw. 1 s bei gleicher Lichtintensität aufgenommen. HepG2-Membrane Sheets wurden durch den Faktor 10 geteilt. Dadurch war ein direkter Vergleich möglich (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 113-316, SEM). Transfer von GM1 durch GLTP von Jurkat E6.1 zu HepG2 war bis zum Erreichen gleicher Konzentrationen möglich. (Abbildung verändert aus Lauria *et al.* 2013)

Nachdem die Transportmechanismen von GLTP untersucht worden waren, wurde überprüft, ob Veränderung der Membraneigenschaften durch GLTP allgemein einen Einfluss auf Proteincluster hat. Zur Untersuchung dessen wurde SNAP-25 als Beispielprotein gewählt, da dieses Cluster bildet (Halemani *et al.* 2010) und diese in Interaktion mit der Lipidumgebung stehen (Salaun *et al.* 2005; Rickman *et al.* 2010).

Bei den Experimenten hierzu wurden aus PC12-Zellen *Membrane Sheets* hergestellt und diese für unterschiedliche Zeiträume mit 50 μ M GLTP behandelt. Wie in Abbildung 38E gezeigt kam es dabei zur Glykolipiddepletion, die durch CTX-Färbung überprüft wurde (nicht gezeigt). *Membrane Sheets* deren Glykolipid-Level auf diese Art und Weise verringert worden war wurden nach Fixierung mit Primärantikörper gegen SNAP-25 inkubiert und mit Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert (Abbildung 40) (Methode siehe Kapitel 4.2.11).

Auf den exemplarischen Bildern der Abbildung 40A erkennt man im lipid-gefärbten Kanal, dass die GLTP-behandelten und unbehandelten *Membrane Sheets* intakt waren. Im SNAP-25-Kanal sieht man einen leichten Unterschied im Clustern der Proteine. Es lagen weniger SNAP25-Cluster vor, die einen helleren Eindruck machten. Der Eindruck des stärkeren Clustern nach Glykolipid-Depletion wurde durch normierte Clustergradanalysen verifiziert (Abbildung 40B)(Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 69-143, SEM). Für alle drei Inkubationszeiten waren leichte Anstiege des Clustergrades im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle zu sehen.

Diese Ergebnisse wiesen nach, dass durch GLTP-veränderte Lipidlevel der Plasmamembran das Clusterverhalten von Proteinen beeinflusst wurde.

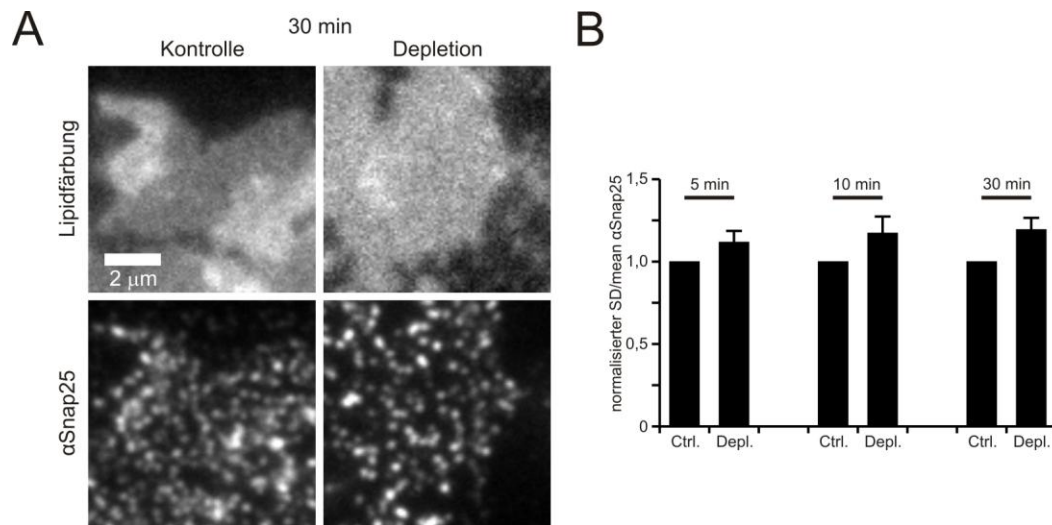


Abbildung 40 GM1-Level verändern das Clusterverhalten von Proteinen

(A) PC12-Membrane Sheets wurden mit 50 µM GLTP 30 min bei 37 °C inkubiert und nach dem Waschen fixiert. Danach wurde entweder mit CTX-AlexaFluor®594 oder αSNAP-25 und fluoreszierendem Sekundärantikörper gefärbt. Nach Depletion von Glykolipiden erschienen weniger SNAP-25-Cluster die heller erschienen.

(B) Clustergradanalyse des Experiments (A) (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 69-143, SEM). Wie in Abbildung 38E wurde auch der verringerte GM1-Gehalt verifiziert (nicht gezeigt). Durch Depletion mit GLTP erhöhte sich der Clustergrad der untersuchten Proteine

5.3.2 Veränderte Glykolipidlevel beeinflussen den TCR

Es konnte gezeigt werden, dass die GLTP-Glykolipiddepletion das Erscheinungsbild von Proteinclustern in der Plasmamembran beeinflusst. Auch für den TCR ist bekannt (siehe Kapitel 2.2.4, S. 27), dass die TCR-Cluster durch bestimmte Lipidumgebungen beeinflusst werden. Zusätzlich wird die T-Zell-Aktivierung mit Separarierungsmechanismen in Verbindung gebracht, die durch bestimmte Lipid-membranmikrokompartimente hervorgerufen werden (Kapitel 2.2.5, S. 36).

Daher wurde untersucht ob GLTP-vermittelte Glykolipidverminderung der nativen Plasmamembran auch Einfluss auf das Verhalten der TCR-Cluster hat (Abbildung 41). Erneut wurde hierfür das konstitutiv im TCR enthaltene CD3ζ als Markerprotein für die TCR-Cluster verwendet (siehe z. B. auch Abbildung 24).

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit des TCR-Clusters von dem Glykolipidlevel wurden die Wildtypvariante von CD3 ζ (CD3 ζ -WT-mEGFP) und die ITAM-defiziente Form (CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP) verwendet (siehe Abbildung 32). Durch die Verwendung der Deletionsmutante sollte geklärt werden, ob bei einem potentiellen Effekt der GLTP-Glykolipidverminderung auf den TCR, die intrazelluläre Domäne von CD3 ζ und insbesondere die ITAM-Motive eine Rolle spielen.

Wenn dies der Fall wäre, so sollte durch Induzieren verschiedener Aktivierungszustände des TCR überprüft werden, ob diese ebenso verändernd einwirken würden. Weiterhin wurde überprüft, ob eine solche glykolipidabhängige Veränderung des TCR-Clustergrades zusätzlich vom Aktivierungsgrad der T-Zellen beeinflusst würde.

Experimentell wurden aus aktivierten und nicht-aktivierten Jurkat E6.1-Zellen, die 48 h zuvor transfiziert worden waren, *Membrane Sheets* hergestellt und diese mit 50 μ M GLTP 30 min bei 37 °C inkubiert, CTX-gefärbt und fixiert.

In Abbildung 41A und B sind Aufnahmen von, wie oben beschrieben, behandelten CD3 ζ -WT-mEGFP-transfizierten Jurkat E6.1 gezeigt und die dazugehörigen Clustergradanalysen. In A sieht man in der Lipidfärbung, dass bei GLTP-Behandlung das Deckglas abseits der *Membrane Sheets* mit Lipiden bedeckt war (wie auch schon zuvor beobachtet, Abbildung 38F). Die *Membrane Sheets* erschienen als Negative mit geringer Färbung, wohingegen der Hintergrund stark gefärbt wurde (z. B. rechtes Bild der Lipidfärbung). Bei längerer Belichtung wurden die *Membrane Sheets* heller und somit wieder sichtbar. Wahrscheinlich wurde die Lipidkomposition der *Membrane Sheets* so stark verändert, dass das TMA-DPH (lipophiler Farbstoff) in der Plasmamembran stark konzentriert wurde, dadurch kam es zum „*Eigenquenching*“ des Farbstoffs. Bei längerer Exposition wurden einige Fluorophore gebleicht und quenchten nicht weiter die anderen, somit stieg die Intensität der *Membrane Sheets* an.

Die untere Reihe der Abbildung 41A zeigt CD3 ζ -WT-mEGFP und die bekannten Effekte der T-Zellaktivierung auf den TCR (Mikrocluster und teilweise Zentralisierung) (siehe Kapitel 5.1.1). Darüber hinaus gab es bei visueller Betrachtung jedoch keine weiteren offensichtlichen Veränderungen des Clusters nach Glykolipiddepletion.

Die Quantifizierung des Clustergrades in Abbildung 41B (Experimente n = 5, ROIs pro Experiment = 19-36, SEM) zeigt den aus Abbildung 36 bekannten Anstieg bei Aktivierung der T-Zellen. Zusätzlich war jedoch im Gegensatz zu dem ersten visuellen Eindruck eine leichte Verringerung des Clustergrades nach Glykolipiddepletion, sowohl bei aktivierten als auch bei nicht-aktivierten T-Zellen, erkennbar.

Die Abbildungen C und D zeigen für die ITAM-deletierte Form von CD3 ζ ähnliche Effekte auf den TCR-Clustergrad bei Aktivierung oder Glykolipiddepletion wie schon für CD3 ζ -WT in Abbildung A und B zu sehen war. Auch CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP hatte bei Aktivierung einen höheren Clustergrad als ohne Aktivierung und die GLTP-Behandlung führte zu vermindertem Clustergrad des TCR (Experimente n = 3, ROIs pro Experiment = 23-29, SEM).

Zusammenfassend war sowohl für die wildtypische Form von CD3 ζ , als auch für die ITAM-defiziente Form bei Glykolipiddepletion durch GLTP sowohl bei *Membrane Sheets* aus inaktiven, wie auch aktiven T-Zellen eine Verminderung des TCR-Clusters zu beobachten.

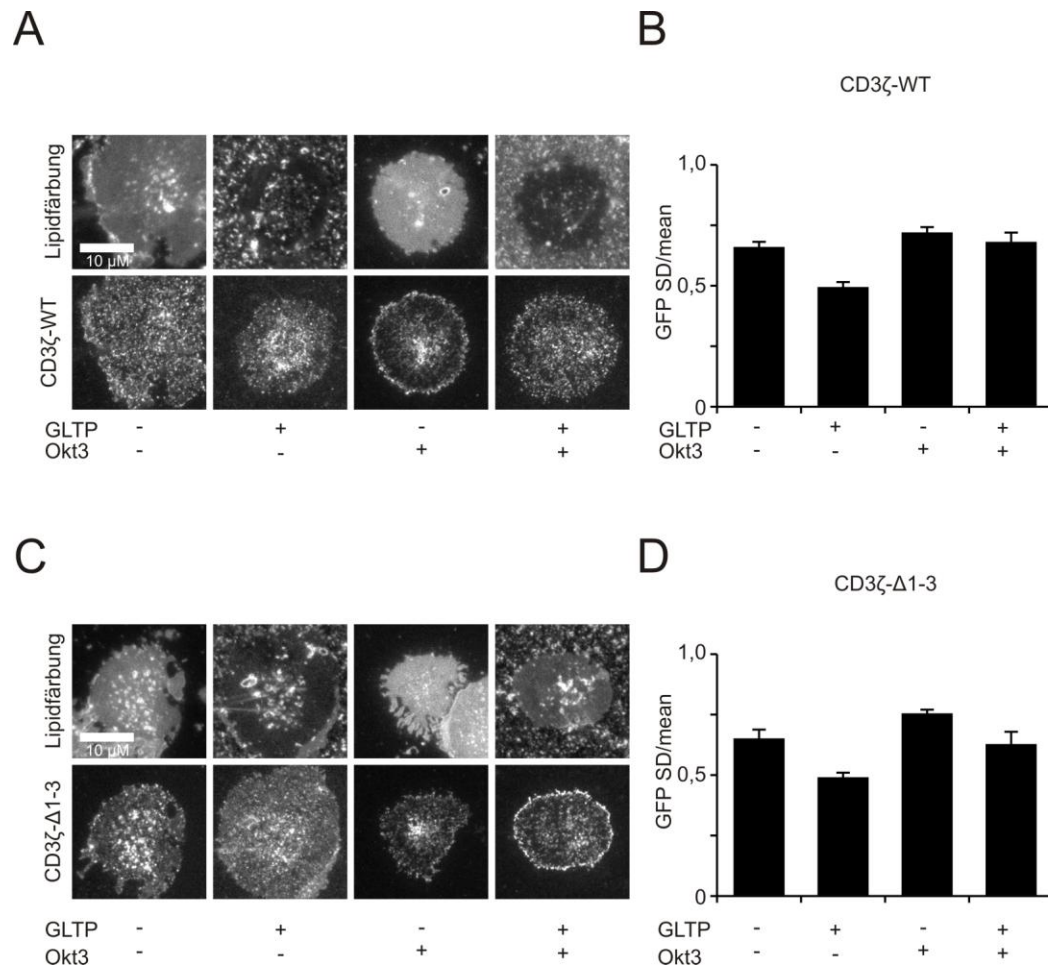


Abbildung 41 Veränderung des TCR-Clusters bei veränderter Membranzusammensetzung (Glykolipid-Depletion)

(A) Transfizierte Jurkat E6.1-Zellen wurden auf aktivierenden/nicht-aktivierenden Deckgläsern adhären und *Membrane Sheets* daraus hergestellt. Die *Membrane Sheets* wurden mit 50 μ M GLTP 30 min glykolipid-depletiert, mit CTX-AlexaFluor®594 gefärbt und fixiert. **(B)** Bei der Quantifizierung des Clustergrades von CD3 ζ -WT-mEGFP zeigte sich ein erhöhtes Clustern in aktivierten Zellen (vergleiche Abbildung 36B, D)(Experimente $n = 5$, ROIs pro Experiment = 19-36, SEM). Die Glykolipiddepletion durch GLTP verringerte das Clustern des TCR. **(C)** Experiment wie in (A), jedoch mit CD3 ζ - Δ 1-3-mEGFP anstelle des Wildtyps. **(D)** Analyse wie in (B) (Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 23-29, SEM). Der Clustergrad wurde durch Aktivierung erhöht und durch Glykolipiddepletion verringert.

Die in Abbildung 41 gezeigte Verringerung des TCR-Clustergrades bei Glykolipiddepletion deutete auf eine generelle Abhängigkeit des TCR-Clustergrades von der nativen Glykolipidkonzentration, oder zumindest des Glykolipids GM1 hin. Zur Überprüfung dessen wurde sich erneut zu Nutze gemacht, dass die GM1-Konzentration der einzelnen Zellen in der Jurkat

E6.1-Population stark variierte (siehe Abbildung 39A). Denn so konnten die unterschiedlichen endogenen GM1-Level der Jurkat E6.1-Zellen mit dem TCR-Clustergrad in Bezug gesetzt werden und auf Korrelation hin überprüft werden.

Dafür wurden Jurkat E6.1-Zellen mit CD3 ζ -WT-mEGFP transfiziert, *Membrane Sheets* erstellt, CTX-gefärbt und fixiert. Danach wurde der Clustergrad von CD3 ζ -WT für jedes *Membrane Sheet* ermittelt und gegen die dazugehörige CTX-Fluoreszenz in einem Streudiagramm aufgetragen (Abbildung 42A) (Experimente $n = 3$, ROIs insgesamt = 314). Das Streudiagramm zeigte zufällig verteilte Werte und keine signifikante lineare Abhängigkeit (bestätigt durch den Wert der Geradensteigung $a = 5,62 \cdot 10^{-6}$ einer software-generierten Ausgleichsgerade, der annähernd Null betrug und somit keine Abhängigkeit anzeigte). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass TCR-Cluster in nativen Jurkat E6.1-Zellen unabhängig vom GM1-Gehalt der Plasmamembran waren und somit auch wahrscheinlich von den anderen Glykolipidleveln.

Zur weiteren Überprüfung dieser Beobachtung wurde untersucht, ob die T-Zell-Aktivierung, die nachweislich den Clustergrad erhöht (Abbildung 41), mit einer Veränderung des GM1-Spiegels in den Plasmamembranen einhergeht. Es wurden die Fluoreszenzintensität CTX-gefärbter *Membrane Sheets* aktivierter und nicht-aktivierter Jurkat E6.1-Zellen gemessen und deren mittlere Intensität berechnet (Abbildung 42B, enthält Daten aus A) (Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 102-153, SEM). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Intensität von *Membrane Sheets* inaktiver oder aktiver Zellen. Dies bedeutete, dass die bei der Aktivierung auftretenden Veränderungen des TCR-Clustergrads nicht durch veränderte GM1-Spiegel hervorgerufen wurden und bestätigte damit die vorher beobachtete (siehe A) Unabhängigkeit des TCR-Clusterverhaltens vom nativen GM1-Gehalt der Plasmamembran.

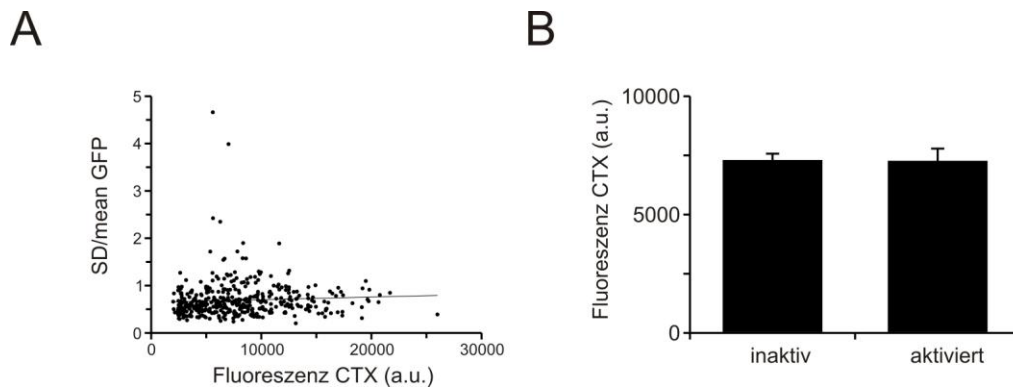


Abbildung 42 Abhängigkeiten zwischen TCR-Clustern und nativem GM1-Membrangehalt

(A) Membrane Sheets aus CD3 ζ -WT-mEGFP-transfizierten Jurkat E6.1 Zellen wurden mit fluoreszierendem CTX gefärbt. Im Kanal des Lipidfarbstoffs TMA-DPH wurden Regionen ausgewählt in denen die Fluoreszenz im CTX- und GFP-Kanal gemessen und analysiert wurden (Experimente $n = 3$, ROIs insgesamt = 314). Es gab keine signifikante Abhängigkeit zwischen Clustergrad und GM1-Gehalt (Geradensteigung $a = 5,62 \cdot 10^{-6}$ und Signifikanzwert $p = 0,2027$).

(B) Jurkat E6.1-Zellen wurden 30 min bei 37 °C in Ringerlösung auf aktivierenden/nicht-aktivierenden Deckgläser adhärirt und ihre Membrane Sheets mit fluoreszierendem CTX gefärbt (Experimente $n = 3$, ROIs pro Experiment = 102-153, SEM). Der GM1-Gehalt von aktivierten Zellen entsprach dem von nicht-aktivierten.

5.4 Abhängigkeit der TCR-Lokalisierung von der extrazellulären CD3 ζ -Domäne

Nachdem untersucht worden war, wie die intrazelluläre Domäne und das Umfeld (Glykolipidspiegel) des CD3 ζ -Transmembranteils sich auf das TCR-Clustern auswirkten, wurde der Fokus auf die Untersuchung des extrazellulären Teils gelegt. Die extrazelluläre Domäne wurde künstlich vergrößert, die Aminosäureabfolge verändert und zusätzlich Deletionsstudien durchgeführt.

Es wurde überprüft, ob eine Vergrößerung des extrazellulären Teils von CD3 ζ zu veränderten Clustereigenschaften des TCR führt. Dazu wurde molekularbiologisch die Nukleotidsequenz von mEGFP zwischen dem Signalpeptid und dem extrazellulärem Teil von CD3 ζ eingefügt (im Folgenden SP-mEGFP-CD3 ζ -WT genannt) (Methode siehe S. 53). In Abbildung 43 ist in A eine schematische Darstellung des daraus entstehenden Fusionsproteins gezeigt, bei der zu Verständniszwecken das bei der Translation abgespaltene Signalpeptid eingezeichnet ist. Das mEGFP hat eine Masse von 26,9 kDa, einen Durchmesser von ~4 nm und ist größer als CD3 ζ .

Jurkat E6.1-Zellen wurden mit den für SP-mEGFP-CD3 ζ -WT und CD3 ζ -WT-mEGFP kodierenden Plasmiden transfiziert und nach 48 h auf PLL-beschichteten Deckgläsern adhäriert. Mit einem konfokalen Mikroskop wurden 3D-Stapelaufnahmen der fluoreszierenden Proteine der Zellen aufgenommen (Abbildung 43B). In der linken Spalte der Abbildung sind konfokale Bilder der basalen Membranebene, in den mittleren Bildern die Medianebene der Zellen zu sehen. Die Seitenansicht in der rechten Spalte wurde aus den 3D-Stapeln konstruiert. Die unterschiedliche Größe der Zellen war für die Jurkat E6.1-Zelllinie nicht ungewöhnlich.

Man erkannte bei Vergleich der Zellen, dass sich das Protein mit extrazellulär lokalisiertem mEGFP vermehrt in intrazellulären Strukturen befand

(vergleiche Bilder der mittleren Spalte von Abbildung 43B) und in der basalen Plasmamembran eine uniformere Erscheinung als CD3 ζ mit intrazellulärem mEGFP hatte (vergleiche Bilder der linken Spalte von Abbildung 43B).

Die Vergrößerung der extrazellulären Domäne von CD3 ζ führte zur vermehrten Lokalisierung in intrazellulären, wahrscheinlich membranöse Organellen innerhalb der T-Zellen. In der Plasmamembran zeigte die veränderte CD3 ζ -Form nicht die charakteristischen Cluster des Wildtypproteins.

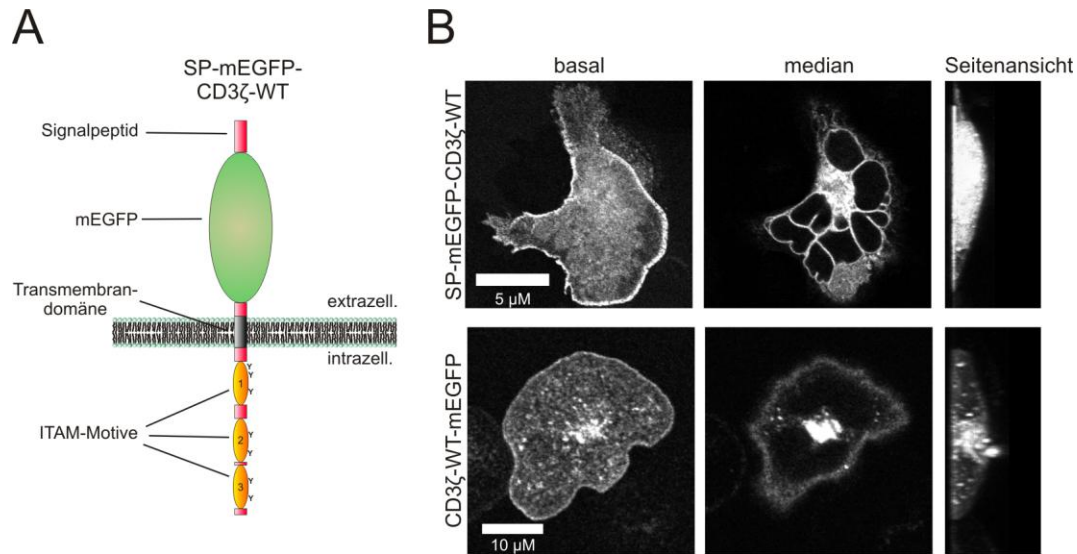


Abbildung 43 Eine große extrazelluläre Domäne von CD3ζ führt zur verstärkten zytosolischen Lokalisierung

(A) Schematische Darstellung des Proteins SP-mEGFP-CD3ζ. Eine mEGFP-Sequenz wurde zwischen das während der Translation abgespaltene Signalpeptid (SP) und die extrazelluläre Domäne von CD3ζ eingebracht. (B) Konfokale Aufnahmen aus einem Bildstapel in von transfizierten, fixierten Jurkat E6.1-Zellen. Zusätzlich je eine x,z-Seitenansicht einer 3D-Rekonstruktion aus dem Z-Bildstapel. CD3ζ-WT-mEGFP lokalisierte neben zentralen intrazellulären Strukturen hauptsächlich in der Plasmamembran als Cluster (vergleiche auch Abbildung 34C). SP-mEGFP-CD3ζ-WT hingegen war intrazellulär in speichenartigen Strukturen sichtbar und in der Plasmamembran eher uniform.

Zur weiteren Untersuchung der extrazellulären Domäne von CD3ζ wurden 7 der 9 extrazellulären Aminosäuren ausgetauscht. Hierdurch sollten Rückschlüsse auf eventuelle Funktionen der einzelnen Aminosäuren bzw. von Aminosäuresequenzmotiven gezogen werden. Abbildung 44 zeigt in A ein genaues Schema der ausgetauschten Aminosäuren zur späteren Abspaltung, die der Erkennungssequenz der TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus*) entsprachen. In Abbildung 44B ist die phänotypische Lokalisierung von Wildtyp-CD3ζ und der CD3ζ-Substitutionsmutante CD3ζ-EC(TEV) in *Membrane Sheets* aktivierter und nicht-aktivierter Jurkat E6.1-Zellen abgebildet.

Der linke Teil von Abbildung 44B (vorab schon in Abbildung 24A gezeigt) zeigt neben den lipidgefärbten *Membrane Sheets* das geclusterte Erscheinungsbild von CD3ζ-WT mit und ohne Aktivierung der Zellen

(beschrieben in Kapitel 5.1.1). Im rechten Teil der Abbildung sieht man das Erscheinungsbild von CD3 ζ -EC(TEV). Es waren keine Unterschiede des Proteinverteilungsmusters von CD3 ζ -WT und CD3 ζ -EC(TEV) zu erkennen, auch die für die Aktivierung typischen Strukturen wurden ausgebildet.

Folglich beeinflusste die extrazelluläre Aminosäureabfolge von CD3 ζ nicht das TCR-Clusterverhalten weder im inaktiven noch im aktivierten Zustand.

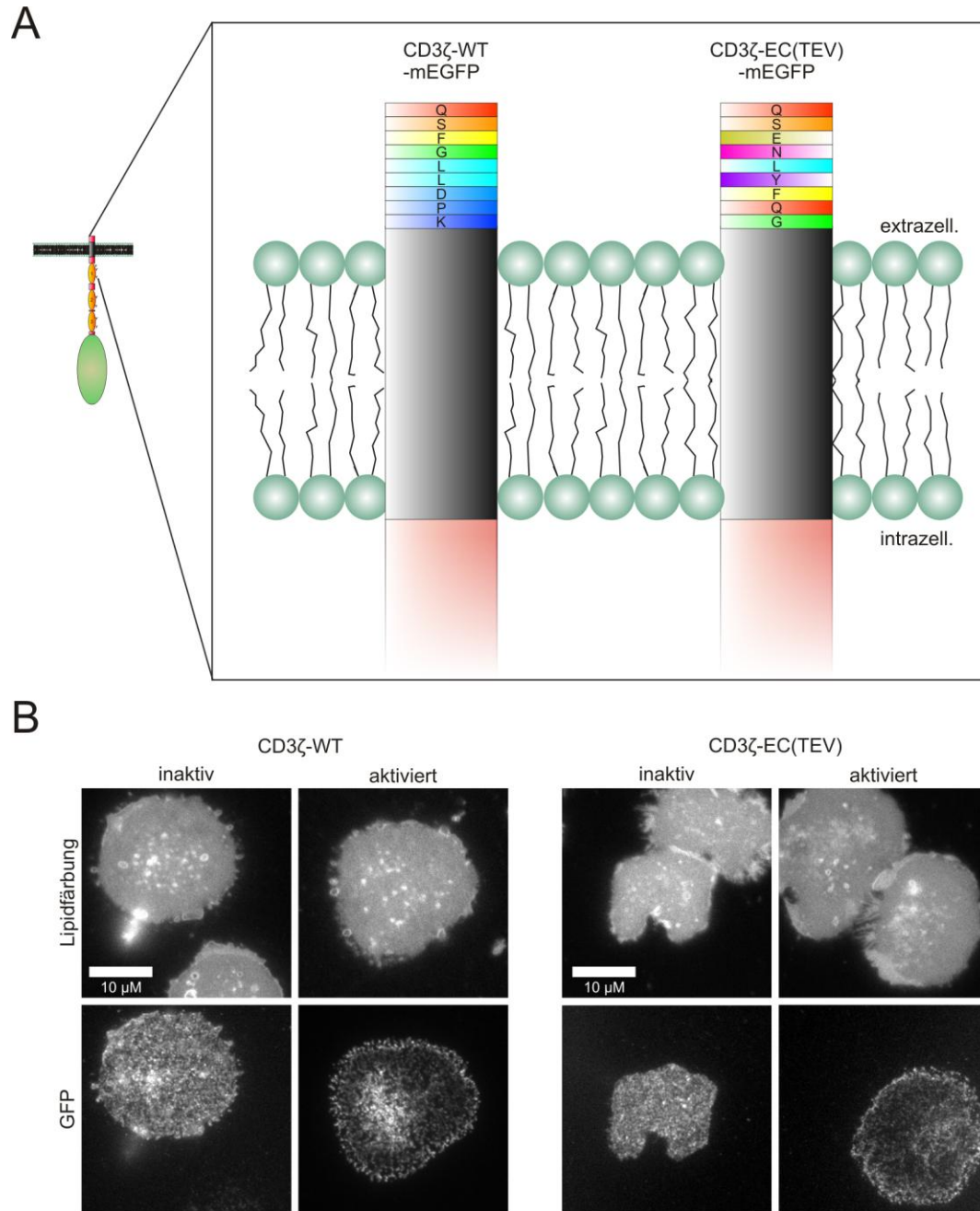


Abbildung 44 Die exakte extrazelluläre Aminosäure-Sequenz von CD3 ζ ist irrelevant für Lokalisierung und Aktivierung des TCR

(A) Schematische Darstellung der extrazellulären Aminosäureabfolge von CD3 ζ -WT-mEGFP und CD3 ζ -TEV(EC)-mEGFP. **(B)** Jurkat E6.1-Zellen wurden mit CD3 ζ -WT-mEGFP oder CD3 ζ -TEV(EC)-mEGFP transfiziert und auf aktivierenden oder nicht-aktivierenden Deckgläsern adhärirt. Aus diesen Zellen wurden *Membrane Sheets* hergestellt (linker Teil vorab in Abbildung 24A gezeigt). CD3 ζ -Wildtyp und CD3 ζ -Mutante wiesen identische Verteilungsmuster, die Nanocluster, auf. Auch bei Aktivierung waren die Proteinvarianten visuell nicht voneinander unterscheidbar, da beide sowohl Mikrocluster als auch eine zentralisierte Ausrichtung der markierten Proteine ausbildeten.

Da die veränderte Aminosäuresequenz des extrazellulären CD3 ζ -Teils keinen Einfluss auf das Clustern des TCR hatte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob eine Verkürzung einen Effekt hätte. Dazu wurden mehrere Deletionsmutanten erstellt, die in Abbildung 45A schematisch dargestellt sind. Das Erscheinungsbild der Mutanten in Jurkat E6.1-*Membrane Sheets* wurde untersucht (B) und eine dazugehörige Clustergradanalyse vorgenommen (Abbildung 45C).

Die Mutanten wurden nach den deletierten Aminosäuren, ausgehend vom Translationsstart, benannt. Nach dieser Namensgebung fehlten bei CD3 ζ - Δ 22-26-mEGFP die Aminosäuren 22 bis 26. Das Signalpeptid (21 Aminosäuren) wurde in der schematischen Darstellung (Abbildung 45A) nicht eingezeichnet, da es während der Translation abgespalten wird.

Bei Deletion der ersten fünf N-terminalen Aminosäuren von CD3 ζ veränderte sich das Clusterverhalten des TCR nicht (CD3 ζ - Δ 22-26). Bei der Entfernung weiterer Aminosäuren erhöhte sich der Clustergrad schrittweise (wie in C zu sehen ist). Die Anzahl der TCR-Punkte verringerte sich und die Cluster veränderten sich bei abnehmendem CD3 ζ -Extrazellulärteil dahingehend, dass der Eindruck entstand auf den *Membrane Sheets* gebundene, vesikuläre Strukturen würden diese morphologische Veränderung bedingen (Abbildung 45B). Dieser Eindruck wurde dadurch verstärkt, dass neben einigen der transfizierten *Membrane Sheets* punktierte GFP-Signale sichtbar waren, als wäre beim Aufreißen der Zelle vesikuläres Material ausgetreten und am Deckglas anhaften geblieben (ähnlich einem Kometenschweif; nicht gezeigt). Eine weitere Beobachtung zu den Deletionsmutanten war die dramatisch verringerte Transfektions- bzw. Expressionseffizienz mit zunehmender Anzahl an entfernten Aminosäuren. Bei der Mutante CD3 ζ - Δ EC waren pro Deckglas ($0,8 \times 10^6$ Zellen) nur ein oder zwei transfizierte *Membrane Sheets* zu finden.

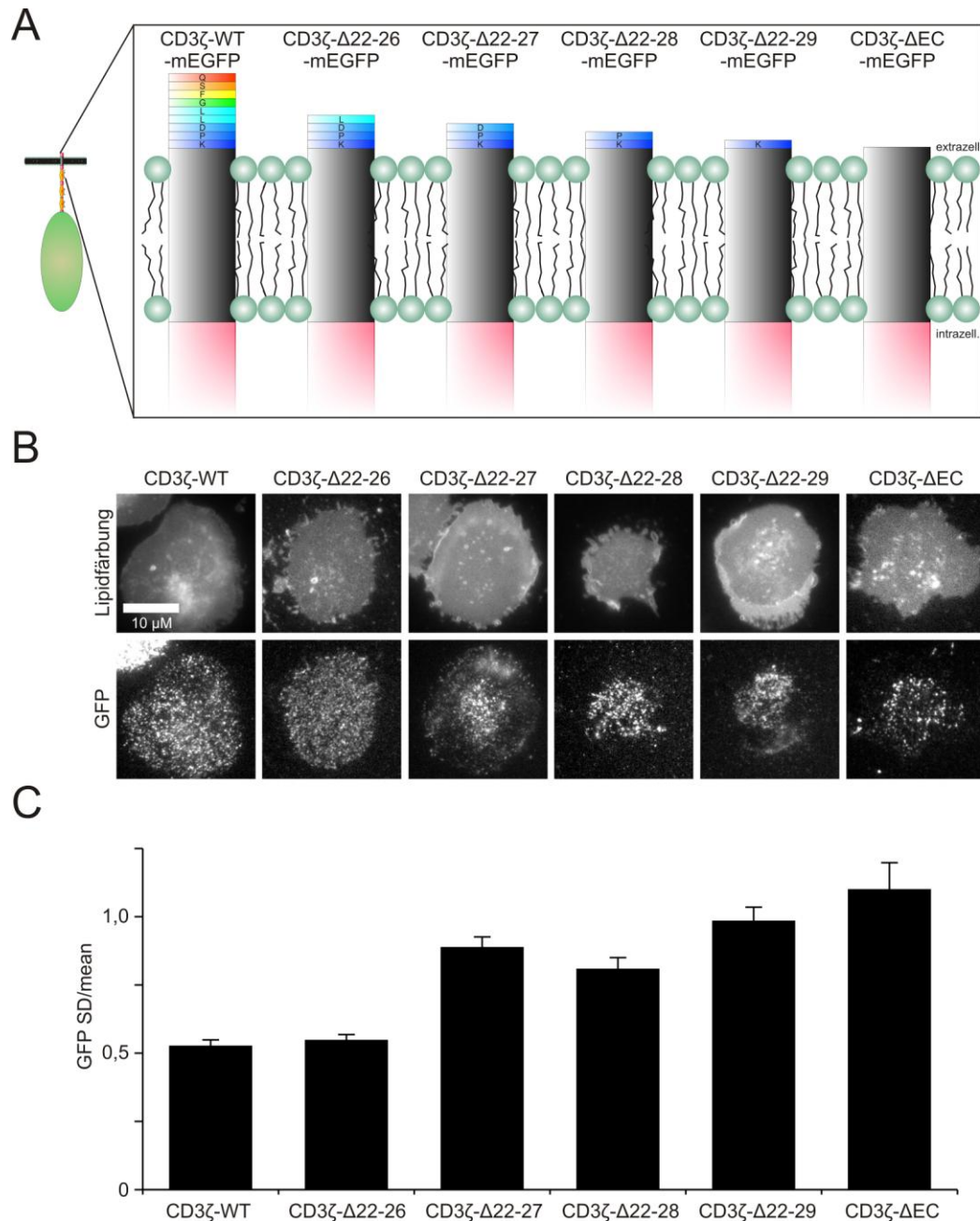


Abbildung 45 Verkürzung der kleinen extrazellulären Domäne führt schrittweise zu mikrocluster-ähnlichen Strukturen mit Anteilen an vesikulärer Lokalisierung

(A) Schematische Darstellung des extrazellulären Teils von CD3ζ-WT-mEGFP und den Mutanten mit Deletionen der extrazellulären Aminosäuren. Das abgespaltene Signalpeptid ist nicht gezeigt. Die Ziffern bezeichnen die deletierten Aminosäuren gezählt vom Translationsstart. **(B)** Qualitativer Vergleich der verschiedenen Konstrukte in Jurkat E6.1-Membrane Sheets. Je kürzer der extrazelluläre Teil war, desto distinkter erschienen die Cluster. **(C)** Quantifizierung des Clustergrades von CD3ζ-WT-mEGFP und den Mutanten. Je mehr Aminosäuren deletiert waren, desto stärker war das Clustern. (Experimente $n = 3$, Membrane Sheets pro Konstrukt pro Experiment = 1 - 20, SEM)

Wie in Abbildung 45 gezeigt führte die Deletion der extrazellulären Domäne von CD3 ζ zu einem vesikelulären Phänotyp des TCR auf *Membrane Sheets*. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Retention der CD3 ζ - Δ EC-mEGFP-Mutante im ER (wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben), wogegen *Western Blot*-Analysen sprachen, aus denen hervorging, dass die Mutante in den Zellen in ihrer dimeren Form vorlag (Daten nicht gezeigt). Diese Dimerisierung war, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, ein Indikator für die korrekte Assemblierung des TCR mit darauf folgendem Transport zur Plasmamembran.

Aus diesem Grund wurde der Fokus auf weitere Lokalisierungsanalysen gelegt, in denen CD3 ζ - Δ EC, die Mutante mit vollständig deletierter Extrazellulärdomäne und dem stärksten Phänotyp, verwendet wurde.

Zur Überprüfung, ob der die Mutante enthaltende TCR zur Oberfläche gebracht wurde und anschließend internalisierte, wurden CD3 ζ - Δ EC-mEGFP bzw. als Kontrolle CD3 ζ -WT-mEGFP-transfizierte Jurkat E6.1-Zellen über Nacht mit Sulforhodamin 101 (SR) inkubiert. SR wird von Zellen endozytotisch internalisiert und eine Kolokalisierung mit den CD3 ζ -Varianten wäre daher ein Hinweis für die Lokalisierung in gleichen zellulären Kompartimenten, wahrscheinlich den endozytotischen Vesikeln.

Die Kolokalisierungsanalysen zeigten, dass sowohl CD3 ζ -WT-mEGFP, als auch CD3 ζ - Δ EC-mEGFP in einigen Fällen mit SR kolokalisierten (Abbildung 46A und B, vergleiche jeweils die Ausschnitte von GFP und SR). Die so ausgemachten Signale der vesikulären Strukturen von CD3 ζ -WT-mEGFP und CD3 ζ - Δ EC-mEGFP konnten allerdings sowohl von Bestandteilen des endozytischen als auch des lysosomalen Weges herrühren.

Um auszuschließen, dass es sich bei den Strukturen um Bestandteile des lysosomalen Degradierungskompartmentes handelte wurde ein Testsystem verwendet, bei dem sich die in Kapitel 4.2.10 beschriebene pH-Abhängigkeit der GFP-Fluoreszenz zu Nutze gemacht wurde.

Das Prinzip des Testsystems beruhte auf der pH-Sensitivität und der Zugänglichkeit des an die CD3 ζ -Varianten fusionierten GFP-Moleküls auf *Membrane Sheets*. Wenn die CD3 ζ -mEGFP-Varianten in endozytischen Vesikeln lokalisiert wären, bliebe auf *Membrane Sheets* die zytosolische Ausrichtung des GFP erhalten und dieses wäre für pH-Wert-Veränderungen zugänglich. Wenn die CD3 ζ -Varianten hingegen lysosomal lokalisiert wären, so wären sie von einer lysosomalen Membran umgeben und folglich nicht mehr dem Zytosol zugänglich und dementsprechend nicht sensitiv für pH-Wert-Veränderungen.

Für die Zugänglichkeitsversuche wurden Jurkat E6.1-Zellen mit CD3 ζ - Δ EC-mEGFP, und CD3 ζ -WT-mEGFP als Kontrolle, transfiziert und *Membrane Sheets* hergestellt. Die Fluoreszenz wurde im Mikroskop gezeigt und dann der Puffer gegen einen vergleichbaren mit pH < 5,0 ausgetauscht und erneut Aufnahmen gemacht (Abbildung 46C). Die Fluoreszenz der transfizierten Proteine war für beide CD3 ζ -Varianten stark vermindert (siehe mittlere Bilder des GFP-Kanals), was für eine pH-sensitive Verschiebung des Absorptionsmaximum (siehe Kapitel 4.2.10) und somit eine Zugänglichkeit der GFP-Moleküle für den umgebenden Puffer sprach. Durch Austausch des Puffers und Rückkehr zu einem pH von 7,4 kehrte die Fluoreszenz wider (Abbildung 46C, rechte Bilder) und die Unversehrtheit der GFP-Moleküle konnte durch die Reversibilität des Effektes bestätigt werden. Die Rückkehr der Fluoreszenz war nicht vollständig. Solche Beeinträchtigungen der Fluoreszenz nach pH-Verminderung sind bekannt. So wurde z. B. gezeigt, dass nach Absenken des pH-Werts auf 4,5 und Rückkehr zu 7,5 nur 80 % des GFPs (GFP aus *Aequorea victoria*) Fluoreszenz aufweisen (Schulte *et al.* 2006). Ein möglicher Grund hierfür könnte eine partielle Irreversibilität der Konformationsänderung in einigen der GFP-Moleküle sein.

Als Resultat des Versuchs konnte gezeigt werden, dass beide CD3 ζ -Varianten für eine pH-Wert-Veränderung zugänglich waren, wodurch eine lumenale Lokalisierung, wie z. B. in Lysosomen (Schulze *et al.* 2009),

ausgeschlossen werden konnte. Folglich gingen die Strukturen der CD3 ζ - Δ EC-Mutante nicht auf eine Lokalisierung im Degradierungsapparat der Zelle zurück.

Weitergehende Lokalisierungsuntersuchungen von CD3 ζ - Δ EC mittels Immunfluoreszenzfärbungen intrazellulärer Kompartimentsmarker waren wegen der sehr geringen Expressionsrate unbrauchbar. Die Ergebnisse waren entweder nicht aussagekräftig oder widersprachen sich an verschiedenen Versuchstagen (Daten nicht gezeigt).

Zusätzliche Versuche wurden unternommen, um die Internalisierung der Deletionsmutante zeitlich nachverfolgen zu können. Dazu sollte die extrazelluläre Domäne der CD3 ζ -EC(TEV)-Mutante durch eine TEV-Protease spezifisch abgespalten werden. Doch bei Inkubation von CD3 ζ -EC(TEV)-mEGFP-transfizierten (siehe Abbildung 44A) Jurkat E6.1-Zellen mit einer TEV-Protease zeigte sich keine Veränderung der GFP-Lokalisierung (Daten nicht gezeigt).

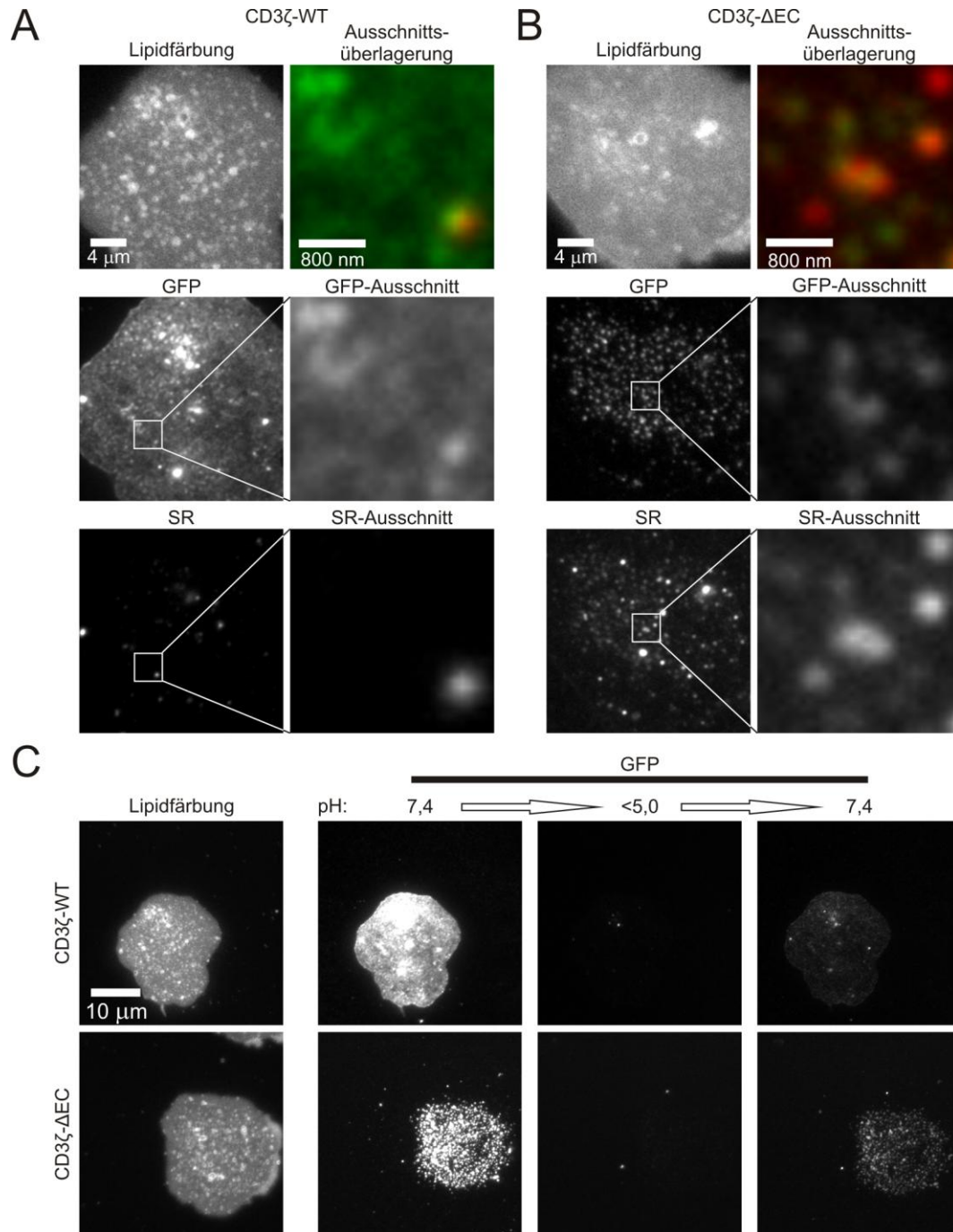


Abbildung 46 Veränderte Lokalisierung des TCR beruht auf Endozytose

(A) Jurkat E6.1-Zellen wurden mit CD3 ζ -WT-mEGFP transfiziert und über Nacht mit 5 μ M Sulforhodamin 101 (SR) inkubiert. Nach Adhäsion auf Deckgläsern wurden *Membrane Sheets* hergestellt und ohne Fixierung mikroskopiert. Die Integrität der Membranen wurde mit TMA-DPH überprüft. In der Überlagerung ist eine Kombination der Ausschnitte des GFP- und SR-Kanals dargestellt (grün: GFP, rot: SR). **(B)** Experiment aus (A) mit CD3 ζ - Δ EC-mEGFP. Das Sulforhodamin 101 kolokalisierte mit beiden Proteinvarianten, überlagerte aber stärker mit CD3 ζ - Δ EC-mEGFP.

(C) *Membrane Sheets* aus (A) und (B) wurden im GFP-Kanal vor, während und nach Umpufferungen aufgenommen (Die Umpufferung veränderte den pH-Wert von 7,4 auf 5,0 und wieder zurück auf 7,4). Die reversible pH-abhängige Verschiebung des Anregungsspektrums von GFP bewies, dass die mEGFP-markierten Proteine dem Zytosol zugänglich vorlagen und nicht luminal angeordnet waren.

Da die Deletion der extrazellulären Domäne von CD3 ζ einen massiven Effekt auf die Lokalisierung des TCR hatte (Internalisierung in endozytotische Strukturen), sollte geklärt werden, welche Bereiche von CD3 ζ an der Initiation der Internalisierung beteiligt waren. Um dies herauszufinden wurde ein Konstrukt erzeugt, das fast ausschließlich aus der CD3 ζ -Transmembrandomäne bestand und keinerlei intrazelluläre ITAM-Domänen aufwies. Dadurch sollte die Rolle der intrazellulären Bestandteile von CD3 ζ bei der beobachteten TCR-Internalisierung ermittelt werden.

Abbildung 47 zeigt im rechten Teil ein Schema des exprimierten Proteins. Der extrazelluläre Teil fehlt wie bei CD3 ζ - Δ EC-mEGFP, doch zusätzlich wurde nach der 54sten Aminosäure der intrazelluläre Teil deletiert (CD3 ζ - Δ EC- Δ AA55-164-mEGFP). Dadurch waren als Abstandshalter zwischen Transmembrandomäne und intrazellulär fusioniertem mEGFP nur 3 Aminosäuren vorhanden und keine ITAM-Domänen.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die beobachteten Strukturen der CD3 ζ -Mutanten CD3 ζ - Δ EC-mEGFP und CD3 ζ - Δ EC- Δ AA55-164-mEGFP keine Unterschiede aufwiesen (Abbildung 47, vergleiche Bilder der GFP-Kanäle von CD3 ζ - Δ EC-mEGFP und CD3 ζ - Δ EC- Δ AA55-164). Folglich konnte die veränderte Lokalisierung des TCR durch CD3 ζ - Δ EC nicht durch die intrazellulären Domänen vermittelt worden sein.

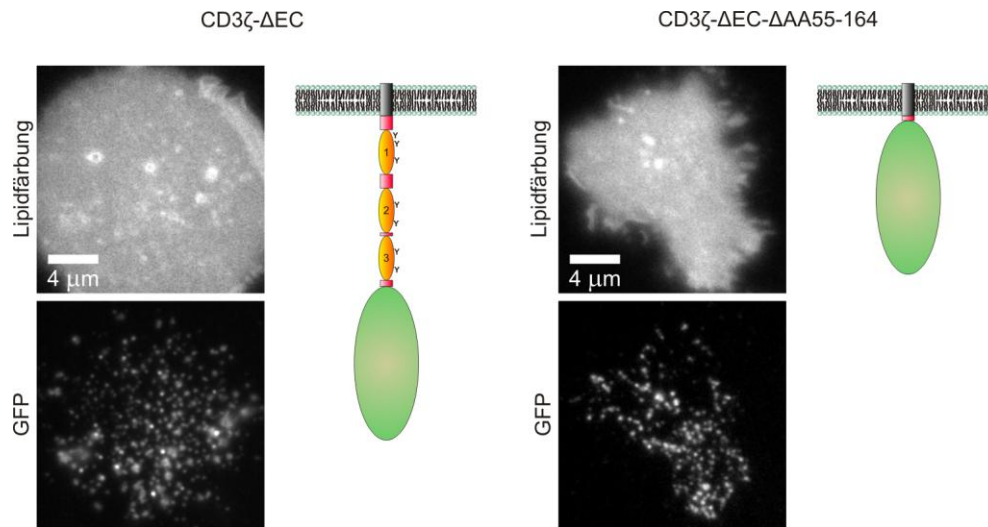


Abbildung 47 Veränderte Lokalisierung des TCR durch CD3ζ-ΔEC ist nicht ITAM-bedingt

Schematische Darstellungen von CD3ζ-ΔEC-mEGFP und CD3ζ-ΔEC-ΔAA55-164-mEGFP. Bei CD3ζ-ΔEC-ΔAA55-164-mEGFP wurden zusätzlich zum extrazellulären Teil auch intrazellulär alle Aminosäuren ab Lys55 deletiert und somit auch die ITAM-Motive. Die beiden Proteinvarianten zeigten keine Unterschiede in der TCR-Lokalisierung in Jurkat E6.1-Membrane Sheets.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen zur Membranorganisation des T-Zell-Rezeptors mit besonderem Fokus auf sein Clusterverhalten in Verbindung mit der T-Zell-Aktivierung untersucht. Bei der Visualisierung des TCR wurde dessen konstitutive Komponente CD3 ζ verwendet und dabei auch die Rolle der CD3 ζ -Domänen und die Bedeutung von physiko- und biochemischen Einflüssen auf das TCR-Clustern überprüft.

Dafür wurde im Hauptteil der Arbeit systematisch und schrittweise auf die strukturellen Komponenten des TCR eingewirkt oder durch Deletion ihre Bedeutung für die TCR-Cluster erforscht (siehe Kapitel 5.1 bis 5.4). Der Einfluss wurde dabei sowohl in nicht-aktivierten wie auch in aktivierten Zellen untersucht.

Das Clusterverhalten des wildtypischen, unbeeinflussten TCR bei T-Zell-Aktivierung wurde mit unterschiedlich mobilen Oberflächen im Kapitel 5.1, unter Verwendung einer SLB, behandelt. Die Bedeutung der intrazellulären CD3 ζ -Domänen für die TCR-Cluster wurde in Kapitel 5.2 erforscht. Ein GLTP-System zur Absenkung der Glykolipidlevel in nativen Plasmamembranen wurde für die Untersuchung des Glykolipideinflusses auf den TCR in Kapitel 5.3 verwendet. Und abschließend wurde die Bedeutung der kleinen extrazellulären Domäne von CD3 ζ bei der Clusterbildung des TCR in Kapitel 5.4 überprüft.

In der folgenden Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit werden erst die Vorarbeiten behandelt (Kapitel 6.1 und Kapitel 6.2), die für die Untersuchung des darauf diskutierten TCR-Clusterverhaltens (Kapitel 6.3) notwendig waren. Als Vorbereitung wurde erstens ein System zur Glykolipidlevelveränderung der Plasmamembran mittels GLTP (siehe Kapitel 5.3.1) geschaffen. Die dabei gewonnenen Schlussfolgerungen und

Implikationen, die sich für die Eigenschaften und Funktionen des GLTPs in Hinblick auf seine physiologische Rolle ergeben werden in Kapitel 6.1 diskutiert. Als zweite Vorarbeit wurde ein SLB-System zur Aktivierung von T-Zellen etabliert (siehe Kapitel 5.1.2), dessen Herstellung, physikalische Eigenschaften sowie Potenz zur Aktivierung von T-Zellen im Detail in Kapitel 6.2 besprochen werden.

Die Diskussion der im Hauptteil gewonnenen Erkenntnisse zu den TCR-Clusterzuständen (siehe Kapitel 2.2.4) und die Einordnung in einen physiologischen Kontext wird im Kapitel 6.3 vorgenommen. Abschließend folgt in Kapitel 6.3.4, basierend auf den eigenen experimentellen Arbeiten und den in der Literatur diskutierten Theorien, ein Modell zur Bedeutung der extrazellulären CD3 ζ -Domäne bei der T-Zell-Aktivierung.

6.1 Verwendung von GLTP zur Veränderung der Glykolipidzusammensetzung in nativen Membranen

Biologische Membranen besitzen unterschiedliche Lipidkompositionen. Die verschiedenen Lipide sind in den beiden Schichten der Membran asymmetrisch verteilt und bilden zum Teil laterale Domänen aus (van Meer *et al.* 2008; van Meer 2011). Dabei beeinflusst die Lipidumgebung das Verhalten und die Lokalisierung von Proteinen (Dowhan & Bogdanov 2011; Surma *et al.* 2012). Für den TCR oder Teile dessen wurden vielfältige Lipidinteraktionen beschrieben. Zytosolische Domänen von CD3 sind über basische Bereiche (*Basic Rich Sequences* = BRS) an azidische Lipide gebunden und lösen sich bei TCR-Aktivierung ab (Aivazian & Stern 2000; Xu *et al.* 2008; Sigalov 2011; Gagnon *et al.* 2012). Es wurde berichtet, dass glykolipid-reiche Mikrodomänen mit TCR-assoziierten Kinasen angereichert sind und tyrosin-phosphorylierte Proteine akkumulieren (Harder & Simons 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass der TCR mit GM1 assoziiert ist (Thomas *et al.* 2003) und die Absenkung von Glykosphingolipidleveln zu verringerter T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion führt (Zhu *et al.* 2011).

Diese Einflussnahme von Lipiden auf den TCR führte zu der Frage, ob Glykolipidlevel in der Membran auch das TCR-Clustern und als Folge dessen die T-Zell-Aktivierung beeinflussen. Bei der hierfür notwendigen Untersuchung sollten Lipidlevel in nativen Membranen möglichst direkt, definiert und physiologisch verändert werden. Als geeignete Werkzeuge boten sich die Lipidtransferproteine (LTPs) (Wirtz & Zilversmit 1968; Wirtz 1997) an, da bekannt ist, dass sie Lipide zwischen Lipidmonolayern *in vitro* transferieren können (Lev 2010). Im Gegensatz zu chemischen Komponenten, wie z. B. den Cyclodextrinen, haben die LTPs durch ihre katalytische Aktivität eine hohe Spezifität für definierte Lipide. Als aussichtsreichster Kandidat für eine Beeinflussung der TCR-Cluster bzw. -Aktivierung durch veränderte Lipidkomposition wurde aus oben genannten Gründen das Sphingolipid GM1 gewählt.

Das zytosolische Glykolipidtransferprotein (GLTP) (Metz & Radin 1980; Tuuf & Mattjus 2007) ist in der Lage, unter anderem GM1, Galaktosylceramid (GalCer) und andere Glykolipide zwischen künstlichen Membranen auszutauschen (Malinina *et al.* 2004; Rao *et al.* 2004). Mutierte Varianten mit verringerten Transfereigenschaften wurden beschrieben (Malinina *et al.* 2004; Ohvo-Rekilä & Mattjus 2011) und konnten gut als Negativkontrollen, zum Ausschluss unspezifischen Transports, genutzt werden.

6.1.1 GLTP als Werkzeug zur Veränderung von Glykolipidleveln in Membranen

Damit GLTP als zuverlässiges Werkzeug zur Veränderung der Glykolipidlevel eingesetzt werden konnte, musste überprüft werden, ob folgende Bedingungen eingehalten werden können:

- die Quantifizierbarkeit der Glykolipidlevel
- die Machbarkeit von Aufreinigung und Lagerung des GLTP
- die Funktionalität des GLTP
- die Unmittelbarkeit des Einwirkens auf die Glykolipidlevel
- der Erhalt von elementaren Strukturen der Membranen
- eine graduelle Variation der Glykolipidlevel
- ein Einfluss der GLTP-Behandlung auf Membranproteineigenschaften

Die unmittelbare Untersuchung des Gehalts von Lipiden in intakten nativen Membranen ist schwierig, da es im Gegensatz zu Proteinen nicht möglich ist, diese genetisch an Fluorophore zu koppeln und darüber zu quantifizieren. Fluoreszenz-gekoppelte Lipide können zwar in Membranen eingebracht werden (Schwarzmann *et al.* 1995; Schwarzmann 2001; Eggeling *et al.* 2009), haben aber gravierende Nachteile. Auf Grund des Austauschs von wichtigen Strukturkomponenten der Lipide gegen die Fluorophore sind die physikochemischen Eigenschaften dieser Lipide stark verändert (Baumgart *et al.* 2007; Sezgin *et al.* 2012) was zu einer Umverteilung der markierten Lipide in der Zelle führen kann. Das Problem dieses veränderten

intrazellulären Transports durch veränderte Lipidstrukturen wurde umgangen, indem die Lipide erst nach Fixierung der Zellen indirekt markiert wurden. So konnte das Glykolipid GM1 (monosialotetrahexosylgangliosid) per fluoreszierendem Choleratoxin B (CTX) spezifisch detektiert werden, was die Quantifizierung über ein weites Konzentrationsspektrum erlaubte (Carton *et al.* 2010). Die GM1-Level können in diesem Fall als Indikator für die generelle Veränderung aller durch GLTP transferierter Glykolipide verwendet werden, da GM1, wie auch andere β -verknüpfte Glykolipide mit Ceramid- oder Glycerolipidrückgrat, von GLTP transferiert wird (Yamada *et al.* 1985, Yamada *et al.* 1986). Das Problem der Quantifizierbarkeit von Glykolipidleveln konnte so adressiert und gelöst werden.

Weiterhin wurde gezeigt, dass sowohl rekombinantes GLTP als Wildtypprotein oder als mutierte Formen aus *E. coli* in ausreichender Reinheit gewonnen und gelagert werden konnte (Kapitel 5.3.1).

Auch die Funktionalität des Proteins konnte gezeigt werden. GLTP entfernt sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig Glykolipide aus nativen Membranen (den *Membrane Sheets*) unterschiedlicher Zelltypen (Abbildung 38). Schon nach 5-minütiger Inkubation verringerte sich die Glykolipidkonzentration um über 80 %. Die Depletion von Glykolipiden aus nativen Membranen durch GLTP ist somit massiv, unmittelbar und beeinflusst über eine weite Konzentrationsspanne nicht die Integrität der Membranen (siehe Lipidfärbungen Abbildung 38).

Desweiteren wurde in dieser Arbeit (Abbildung 38A) und von Kollegen der Arbeitsgruppe gezeigt, dass GLTP sowohl Insertion von GM1 aus Liposomen in ganze Zellen als auch in beide Lipidschichten nativer *Membrane Sheets* vermitteln kann (Lauria *et al.* 2013). Es hatte den Anschein, dass die Insertion in die intrazelluläre Lipidschicht der Plasmamembran geringfügig besser als in die extrazelluläre Lipidschicht funktioniert. Grund dafür könnte eine bessere Zugänglichkeit der intrazellulären Lipidschicht im Vergleich zur

extrazellulären Lipidschicht für GLTP oder CTX sein. Denn in *Membrane Sheets* ist die intrazelluläre Lipidschicht dem umgebenden Medium gegenüber direkt exponiert. Dagegen resultiert die extrazelluläre Lipidschicht aus der Kontaktstelle der Zelle zum Deckglas wodurch nur ein kleiner Spalt zwischen Lipidschicht und Deckglas für die Diffusion von Molekülen zugänglich ist. Eine weitere mögliche Erklärung für die ungleiche CTX-Färbung der beiden Lipidschichten nach Insertion, könnte in der ungleichen Verteilung des GM1 begründet liegen. In der extrazellulären Lipidschicht hat GM1 eine stark geclusterte Erscheinung wohingegen in der intrazellulären Lipidschicht ein uniformes Verteilungsmuster vorherrscht. Das Clustern des GM1 könnte die Bindung des CTX erschweren, wodurch die extrazelluläre Lipidschicht bei gleichem GM1-Gehalt nur schwächer angefärbt würde (Lauria *et al.* 2013).

Zusätzlich zur ausschließlichen Depletion oder Insertion von Glykolipiden konnte auch die Kombination beider GLTP-Funktionen gezeigt werden. Bei Inkubation von nativen Membranen unterschiedlicher Glykolipidkonzentrationen zeigte sich Glykolipidtransport aus den Membranen hoher Glykolipidkonzentration hin zu denjenigen geringer Konzentration (Abbildung 39). Dies war sowohl bei Konzentrationsunterschieden innerhalb einer Zellpopulation, als auch bei übergreifendem Transport zwischen *Membrane Sheets* zweier Zelllinien der Fall. Offensichtlich hängt die Bestimmung einer Membran als Glykolipiddonor oder -akzeptor nur von ihrem aktuellen Glykolipidlevel und dem Beladungszustand des GLTPs ab. GLTP hat somit eine katalytische Funktion und gleicht Unterschiede zwischen Membranen wie in einem Fließgleichgewicht aus, ohne selbst richtungsbestimmend zu wirken. Dies stimmt überein mit der Beobachtung, dass Depletion effizienter nach vorheriger Beladung ist (Lauria *et al.* 2013). Unmittelbares Beeinflussen der Glykolipidlevel nativer Membranen ist mit GLTP bei gleichzeitiger Erhaltung der Integrität der Membranen möglich.

Die graduelle Veränderung der Glykolipidlevel in nativen Membranen kann sowohl über die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit als auch mittels transferlimitierter GLTP-Mutanten erreicht werden. Die Mutante GLTP-W96A wurde von Malinina *et al.* beschrieben und zeigt 1-3 % Resttransferaktivität (Malinina *et al.* 2004). Für GLTP-W142A wurde verminderte Lipidbindefähigkeit (50 %) und eine daraus resultierende Transferaktivität von nur wenigen Prozent in einem SPR-Assay (*Surface Plamon Resonance*) mit immobilisierten Liposomen gezeigt (Ohvo-Rekilä & Mattjus 2011). Auch in dieser Arbeit war die Insertion und somit auch die Fähigkeit zum Lipidtransfer beeinträchtigt (Abbildung 38A).

Zusammengenommen können also die Glykolipidlevel, zusätzlich zur Variation von Zeit oder Konzentration während GLTP-Inkubation, auch durch Einsatz der unterschiedlichen GLTP-Mutanten in ihrer Höhe verändert werden. Mechanistische Unterschiede in der Depletions- bzw. Transferbeeinträchtigung der Mutanten könnten bei weitergehenden Experimenten genutzt werden (GLTP-W96A bindet an Membranen, aber inkorporiert Lipide nicht, GLTP-W142A hat schlechte Membranbindeeigenschaften).

Die vorliegende Arbeit zeigte die funktionelle Eignung von GLTP zur direkten Veränderung der Lipidkomposition nativer Membranen. Um zu untersuchen, ob diese Beeinflussung die Eigenschaften von Membranproteinen verändert, wurde exemplarisch das membranverankerte SNAP-25 untersucht. Es ist bekannt, dass SNAP-25 in Abhängigkeit seiner Palmitoylierung und cysteinreicher Domänen mit cholesterol- und sphingolipidreichen „*Lipid Rafts*“ assoziiert ist (Salaun *et al.* 2005). Daher sollte es stark auf die Depletion des Gangliosides (enthält ein Sphingosin-rückgrat) GM1 und anderer Glykolipide durch GLTP reagieren.

Bei Glykolipiddepletion von PC12-Membrane Sheets durch GLTP und anschließender Antikörperfärbung gegen SNAP-25 konnte nur ein kleiner

Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten *Membrane Sheets* ausgemacht werden (siehe Abbildung 40). Dieser geringe Unterschied des Clustergrades geht wahrscheinlich auf die zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen von SNAP-25 (Halemani *et al.* 2010) zurück, die verhindern dass große Veränderungen der Clusterintegrität stattfinden. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Sphingolipidabhängigkeit von SNAP-25 mit dem Werkzeug GLTP könnten die Diskussion über SNAREs und „*Lipid Rafts*“ (Lang 2007) bereichern.

Wenngleich der Effekt auf SNAP-25 nur gering war, bleibt festzuhalten, dass von einer Beeinflussung von Proteinen durch GLTP-vermittelte Lipidlevelveränderungen ausgegangen werden kann.

6.1.2 Implikation für die physiologische Relevanz von GLTP in Zellen

Als ein Ergebnis dieser Arbeit konnte die Eignung von GLTP als Werkzeug für die Veränderung von Glykolipidleveln in nativen Membranen gezeigt werden.

Es ergibt sich jedoch die Frage, ob mit den gewonnenen Daten zusätzlich ein Beitrag zur Klärung der Frage welche physiologische Funktion GLTP innerhalb von Zellen ausübt geleistet werden kann.

In bisherigen Untersuchungen zur Rolle von GLTP innerhalb des Lipidmetabolismus der Zelle wurden Funktionen als Transporter (Sasaki 1990) oder als Lipidsensor (Malakhova *et al.* 2005) vorgeschlagen. Zusätzlich ist eine Beteiligung an der Lipidbiosynthese denkbar, da die Überexpression von GLTP zu veränderten Glukosylceramid- und Sphingomyelinleveln führt (Tuuf & Mattjus 2007). Auch der Hinweis, dass *GLTP* Genexpression ceramid-reguliert, spricht für eine Beteiligung von GLTP an der Lipidhomöostase (Zou *et al.* 2011).

Die hier gemachten Studien zeigen, dass der ausschließlich konzentrationsgetriebene GLTP-vermittelte Transport von Glykolipiden zwischen nativen Membranen möglich ist. Bei geringen GLTP

Konzentrationen im Bereich von 1 μM findet GM1-Austausch zwischen weit entfernten Membranen statt (siehe Kapitel 5.3.1 Abbildung 39). Unter Berücksichtigung der Entfernungsmaßstäbe in den *in-vitro*-Experimenten kann man voraussagen, dass intrazellulär anstelle von 1 μM submikromolekulare Konzentrationen von GLTP effizient Glykolipide nicht-vesikulär transportieren könnte. Tatsächlich wurden intrazelluläre Konzentrationen im Bereich von 100 nM gefunden (persönliche Kommunikation mit Dr. Ines Lauria und Prof. Dr. Thorsten Lang, LIMES-Institut, Universität Bonn), was diese Hypothese unterstützt. Diese Hinweise stärken die Hypothese von GLTP als intrazellulärem, konzentrationsgetriebenem Glykolipidtransporter zwischen Zellorganellen unterschiedlicher Lipidkomposition (Lauria *et al.* 2013).

6.2 Herstellung einer funktionalen, mobilen Oberfläche zur T-Zell-Aktivierung

Rezeptoren auf der Zelloberfläche reagieren nach Bindung an ihre Liganden häufig mit Veränderung ihres Clusterzustandes (Isenberg *et al.* 1987; Patel *et al.* 2002) und/oder mit Konformationsänderungen (Venkatakrishnan *et al.* 2013). Solche Veränderungen können gut durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden, da hierdurch Zustände und Vorgänge non-invasiv in lebenden Zellen zeitlich und örtlich präzise erfasst werden können. Ein Ziel dieser Arbeit sollte es sein, genauere Einsichten in das Verhalten des TCR bei der Ligandenbindung und der Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) zu gewinnen.

Viele Liganden der Immunrezeptoren sind auf anderen Zellen gebunden. So interagiert der B-Zell-Rezeptor (BCR) mit Antigenen auf Zielzellen (Batista *et al.* 2001; Carrasco *et al.* 2004), die Fc Rezeptoren binden an Antikörper, gebunden an Pathogene (Janeway 2008) und der T-Zell-Rezeptor (TCR) bindet an Peptid-MHC-Komplexe auf antigen-präsentierenden Zellen (Samelson *et al.* 1986; Dustin 2009). Im Falle des hier untersuchten TCR ist die Aktivierung durch lösliche, monomere oder immobile, oberflächengebundene TCR-Agonisten nicht ausreichend, um eine langfristige Signalerhaltung zu gewährleisten (Boniface *et al.* 1998) und eine Immunologische Synapse (IS) zu induzieren (Bunnell *et al.* 2002). Für die Initiation einer IS bedarf es einer aktivierenden Zelle (oder α TCR-antikörper-beschichteten Latexkugel) als Gegenspieler für die T-Zelle. Dadurch ergibt sich eine gekrümmte Kontaktfläche der IS, die ihre genaue Erfassung z. B. durch einen konfokalen optischen Schnitt, erschwert.

Aus diesem Grund wurde eine *Supported Lipid Bilayer* (SLB) erstellt, welche die Oberfläche einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) imitiert und es so ermöglicht die IS auf einer planaren Oberfläche zu initiieren. Dadurch ist eine mikroskopische Betrachtung der IS innerhalb eines optischen Schnittes z. B.

per TIRF(*Total Internal Reflection Fluorescence*)-Mikroskopie möglich, die eine genaue Analyse der IS-Bestandteile erlaubt.

Solche künstlichen Lipidschichten werden seit den 1970ern in der Immunbiologie verwendet (Kinsky & Nicolotti 1977), um Bindeeigenschaften von Immunzellen zu untersuchen (Hafeman *et al.* 1981); auf diesen wurde TIRF-Mikroskopie etabliert (McConnell *et al.* 1986; Watts *et al.* 1986). Die erste auf einer SLB initiierte IS wurde 1999 gezeigt (Grakoui *et al.* 1999).

6.2.1 Verwendung einer *Supported Lipid Bilayer* zur Initiation einer Immunologischen Synapse

Wenn SLBs genutzt werden sollen, um die Immunologischen Synapsen als T-Zell-Antwort auf definierte Signale zu untersuchen, müssen nach den bisherigen Forschungsergebnissen SLBs folgende Grundvoraussetzungen erfüllen:

- Integrität der Oberfläche
- Agonistische Funktion zur Initiation des TCR-Signals
- ICAM1-Präsenz zur Verstärkung des TCR-Signals
- Mobilität der Komponenten
- Adhäsion von T-Zellen auf der SLB

Die SLBs wurden wie erstmals beschrieben in Brian und McConnell 1984 und McConnell 1986 mittels selbst-assemblierenden Liposomen auf gereinigten Deckgläsern erstellt. Um möglichst fluide Lipidschichten zu erstellen, wurden die Deckgläser vorher mittels Piranha-Lösung hydroxyliert (Seu *et al.* 2007). Um zu überprüfen, wie hoch die notwendige Lipidkonzentration an Liposomen sein muss, um vollständige Doppellipidschichten zu erhalten, wurde der lipophile Farbstoff TMA-DPH verwendet. Durch eine Konzentrationsreihe wurde die Minimalkonzentration von 2 mg/ml Lipid (Nye & Groves 2008) zur Erstellung einer intakten *Supported Lipid Bilayer* bestätigt (Abbildung 27). Die so überprüfte Integrität

der SLB ist wichtig für die Diffusionsfähigkeit und homogene Verteilung der Lipide mit den daran gebundenen Proteinen (ICAM1 und α TCR), damit die Plasmamembran einer antigen-präsentierenden Zelle hinreichend imitiert wird.

Die Initialisierung der Immunologischen Synapse einer T-Zelle bedarf der Aktivierung und der Aufrechterhaltung von TCR-Signaltransduktion. Diese kann entweder durch Bindung von peptid-beladenen MHC-Molekülen (Grakoui *et al.* 1999) oder von anti-TCR-Antikörpern (Carrasco *et al.* 2004; Kaizuka *et al.* 2007) an der SLB erreicht werden. Wegen der besseren Verfügbarkeit und einfacheren Handhabung wurden biotinylierte, aktivierende anti-TCR-Antikörper benutzt (Kaizuka *et al.* 2007; Shen *et al.* 2009; Hsu *et al.* 2012). Diese wurden über Streptavidin an die SLB gebunden. Die generelle Potenz der Antikörper zur TCR-Aktivierung wurde auf immobilisierten Oberflächen durch die Ausbildung von TCR-Mikroclustern nachgewiesen (Kapitel 5.1.1). Es wurde gezeigt, dass wenige TCR-Agonisten ausreichend sind um TCR-Signaltransduktion zu initiieren (Irvine *et al.* 2002; Manz *et al.* 2011). Daher wurde für die Herstellung aktivierender SLBs mit 0,02 % (Kaizuka *et al.* 2007) die Konzentration biotinylierter Lipide gering gehalten. Diese dienten als Ankerpunkt für Streptavidin das wiederum den agonistischen Antikörper band. Die spezifische Bindung des Streptavidins an die SLB und des daran gebundenen anti-TCR-Antikörpers wurde bestätigt (Abbildung 27) und so die potentielle Möglichkeit der SLB zur T-Zell-Aktivierung geschaffen.

Zur vollen Aktivierung von T-Zellen bei physiologischen Konzentrationen agonistischer Moleküle sind Kostimulatoren erforderlich. Die *trans*-Interaktion zwischen ICAM1 und LFA-1 auf den APC- bzw. T-Zell-Oberflächen unterstützt die TCR-Aktivierung (van Seventer *et al.* 1990), indem die Sensitivität der T-Zellen für ihre Antigene 100-fach erhöht wird (Bachmann *et al.* 1997). Die Beteiligung von LFA-1/ICAM1 an der IS wurde 1998 gezeigt

(Wülfing *et al.* 1998; Monks *et al.* 1998) und die Segregation von ICAM1 auf SLBs bei T-Zell-Kontakt nachgewiesen (Dustin *et al.* 1998). Als essentieller kostimulatorischer Bestandteil der SLBs wird ICAM1 generell verwendet (Wülfing *et al.* 1998; Grakoui *et al.* 1999).

Die Bindung des extrazellulären Teils von ICAM1 an die SLB kann dabei entweder über einen GPI-Anker erfolgen (Wülfing *et al.* 1998) oder mittels eines His-Tags an Ni^{2+} -chelatierende Lipide (Nye & Groves 2008). In dieser Arbeit wurde ein histidin-markiertes, transmembrandomänen-deletiertes ICAM1 hergestellt und aufgereinigt. Dieses konnte gut an eine SLB gebunden werden; dabei wurde auch bestätigt, dass auf diese Art hergestelltes ICAM1 als Monomer und lateral unbeschränkt auf der SLB vorliegt (Xu *et al.* 2011).

Bei der Erstellung des ICAM1-DNS-Konstruktes wurde die natürlich vorkommende Variante K469E (Rs5498) verwendet. Diese Variante kommt bei 40 % der japanischen bzw. 46 % der amerikanischen Population vor (Iwao *et al.* 2001) und wurde in Veröffentlichungen als Wildtyp angegeben (Yang *et al.* 2004). Die Mutation befindet sich nicht in einer der für die LFA-1-Bindung wichtigen *IG-like C2-type* Domänen (Staunton *et al.* 1990). Deshalb wurde diese ICAM1-K469E-Variante als physiologisch erachtet und für die Erstellung einer aktivierenden SLB genutzt.

Die Expression und Aufreinigung des glykosylierten ICAM1 war bei Verwendung eines Hek293EBNA Systems mit anschließender Ni^{2+} -NTA-Aufreinigung erfolgreich (Abbildung 26). Für die Erstellung einer SLB wurde ~1 % Ni^{2+} -chelatierendes Lipid verwendet und mit je 100 nM ICAM1 10-20 min inkubiert; das reicht aus, um Immunologische Synapsen mit T-Zellen zu induzieren (Nye & Groves 2008). Die spezifische Bindung von His-markiertem, kostimulatorischem ICAM1 an die *Supported Lipid Bilayer* mittels Ni^{2+} -chelatierender Lipide wurde mit einer GFP-markierten Version des ICAM1 gezeigt (Abbildung 27).

Ein weiteres Charakteristikum einer hinreichend aktivierenden SLB ist die Mobilität der einzelnen Komponenten. Durch FRAP wurden die Diffusionskonstanten von ICAM1, Streptavidin und antikörpergebundenem Streptavidin gemessen. Diese befanden sich im Bereich der beschriebenen lateralen Geschwindigkeiten (Shen *et al.* 2009), die charakteristisch für eine aktivierende SLB sind (Abbildung 28). Eventuelle Quervernetzung von SLB-gebundenem Streptavidin durch mehrfach biotinylierte Antikörper wurde durch Untersuchungen mit freiem, löslichem und kompetitiv eingesetztem Biotin ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Die Mobilität der aktivierenden Komponenten, die an die SLB gebunden waren, sollten ausreichend gewesen sein, um Immunologische Synapsen zu initiieren.

Um endgültig die hinreichende Imitation einer APC durch die SLB zu bestätigen, wurde ihre Fähigkeit zur Vermittlung von Zelladhäsion betrachtet. T-Zellen binden und interagieren mit der SLB, wie z. B. in Abbildung 29A gezeigt ist. Die Zellen adhärirten auf der Oberfläche, spreizten sich und bildeten große Kontaktflächen, in denen oberflächen-gebundenes ICAM1 in Cluster zusammengezogen wurde (Dustin *et al.* 1998). Die adhäsiven Kräfte, die zwischen Zelle und SLB wirkten, waren so groß, dass sogar *Membrane Sheets* auf der SLB hergestellt werden konnten (Abbildung 31).

Die notwendigen Voraussetzungen für die Erstellung einer TCR-aktivierenden SLB konnten wie oben beschrieben erfüllt werden. Eine homogene, intakte Lipiddoppelschicht wurde erstellt, an der TCR-Agonisten und Kostimulatoren unter Wahrung der Mobilität gebunden wurden. Darauf konnten die T-Zellen adhärirt werden, die daraufhin mit den Komponenten interagierten.

6.2.2 Initialisierung von TCR-Mikroclustern und Ausbildung einer IS

Trotz der im vorherigen Kapitel beschriebenen Verifizierung der Aktivierungspotenz der *Supported Lipid Bilayer* kam es im Experiment bei T-Zellen nur sehr selten zur Ausbildung von Strukturen, die einer klassischen Immunologischen Synapse nach Monks *et al.* 1998 oder Grakoui *et al.* 1999 ähnelten (Abbildung 29 und Abbildung 30).

Es wurde gezeigt, dass Jurkat E6.1 T-Zellen auf der SLB adhären, sich währenddessen ausspreizen und anschließend wieder zusammenziehen. Die Interaktion der T-Zellen mit auf der SLB gebundenem ICAM1 führte zur Ausbildung von Clustern und deren zentripetaler Bewegung. Die Formierung von TCR-Mikroclustern wurde initiiert und konnte sowohl indirekt über aktivierende Antikörper (α TCR) als auch direkt durch intrazellulär fluoreszenz-markierte Teile des TCR (CD3 ζ -WT-mEGFP) nachgewiesen werden. Ebenso erfolgte der IS-vorbereitende Schritt der Separierung von ICAM1-LFA1-Clustern von Agonist-TCR-Mikroclustern. Die Ausbildung eines definierten cSMACs (*central Supramolecular Activation Cluster*) durch den TCR stellte sich allerdings auch nach über 60 min nur sehr selten ein und war in den übrigen Fällen unvollständig oder nicht zu erkennen. ICAM1 wurde aggregiert, bildete aber nur selten die definierten ringförmigen Strukturen des pSMACs (*peripheral Supramolecular Activation Cluster*) aus.

Folgende Gründe könnten hierfür maßgeblich gewesen sein:

Bei den Jurkat E6.1 T-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie und damit um exponierte Zellen, die potentiell über viele Generationen genetische Veränderungen durch Umwelteinflüsse erfahren haben. Die leukämischen Zellen sind immortalisiert und weisen teilweise Polyploidien und chromosomale Deletionen auf (Schneider *et al.* 1977). Um auszuschließen, dass sich die hohe Passagenzahl und somit das Alter der Jurkat E6.1-Zellen negativ auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Immunologischen Synapsen

auswirken, wurden jüngere Zellen verwendet. Doch auch diese Zellen bildeten keine Immunologischen Synapsen aus (nicht gezeigt).

Ein weiterer zellbezogener Faktor, der negativen Einfluss auf die Initialisierung einer IS gehabt haben könnte, ist das LFA-1-Expressionslevel. Dieses ist in vielen Jurkat-zellklonen gering (Kommunikation mit Prof. PhD Michael Dustin, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York; siehe Anhang). Gegen die Jurkat E6.1-Zellen als negativ beeinflussender Faktor der IS-Ausbildung sprechen jedoch drei Fakten: Erstens waren die untersuchten Zellen in der Lage sich, wie in Alarcón *et al.* 2011 beschrieben, bei Adhäsion auf der SLB sowohl zu Spreizen und Lamellopodien auszubilden. Zweitens schloss sich daran eine Kontraktion unter ICAM1-Rekrutierung an, was für ein ausreichendes LFA-1-Level sprach. Und drittens konnte die generelle Funktionsfähigkeit der Jurkat E6.1-Zellen durch die Detektion von IL-2 (Interleukin 2) nach Aktivierung verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Somit lassen das Adhäsionsverhalten auf aktivierenden Flächen, die Ausbildung von Mikroclustern, die Erwähnung der exakten Zelllinie in vorherigen Publikationen (Bunnell *et al.* 2002; Kaizuka *et al.* 2007; Hsu *et al.* 2012) und die IL-2 Sekretion darauf schließend, dass die grundlegenden Signalwege der Jurkat E6.1-Zellen auch in der vorliegenden Untersuchung intakt waren. Damit ist eine Defizienz der allgemein anerkannten und hier verwendeten Jurkat E6.1-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Es wäre jedoch sinnvoll die Aktivierung von primären Leukozyten auf aktivierenden SLBs zu testen um die Reaktion der Jurkat E6.1-Zellen mit denen möglichst nativer Zellen vergleichen zu können.

Die konstituierenden und gebundenen Bestandteile der SLB und ihre Konzentration und Mobilität müssen weiterhin diskutiert werden. In Monks *et al.* 1998 wurde ein cSMAC nach 13 min beschrieben und in Grakoui *et al.* 1999 bereits nach 5 min. In einer neuen Publikation wurde der

Zusammenhang zwischen Mobilität der Liganden und Formierungsgeschwindigkeit der IS und der T-Zell-Aktivierung beschrieben (Hsu *et al.* 2012). Darin wird klar, dass sich die Geschwindigkeit der im cSMAC fusionierenden Mikrocluster in Abhängigkeit der Ligandenmobilität stark vermindert, bis hin zur vollständigen Immobilität, und als Folge dessen die IS ausbleibt. Bei Betrachtung der gemessenen Ligandenmobilitäten ($0,16 \mu\text{m}^2/\text{s}$), gezeigt in Abbildung 28, fällt auf, dass diese gegenüber den in Shen *et al.* 2009 angegebenen Werten ($0,23 \mu\text{m}^2/\text{s}$) leicht verringert sind. In Shen *et al.* 2009 bildeten sich Immunologische Synapsen nach 30 min vollständig aus, wohingegen in dieser Arbeit nach 1 h überwiegend keine cSMACs detektierbar waren. Bei Vergleich der in Hsu *et al.* 2012 gezeigten Abhängigkeit von Ligandenmobilität mit cSMAC-Ausbildung ist es unwahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit gemessenen Abweichungen ausreichend gewesen wären, um die Bildung der IS so weit zu verlangsamen. Denn darin wurde bei einer Diffusionsgeschwindigkeit von nur $0,09 \mu\text{m}^2/\text{s}$ der TCR-Liganden nach einer Stunde schon eine starke Aggregation des TCR gezeigt und bei $0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ schon nach 40 min ein vollständiger cSMAC (Hsu *et al.* 2012). Deshalb wäre es zu erwarten gewesen, dass bei einem Diffusionswert der Liganden von $0,16 \mu\text{m}^2/\text{s}$, der zwischen dem von Shen *et al.* und Hsu *et al.* lag, zumindest nach 1 h eine vollständige IS mit cSMAC entwickelt worden sein sollte, was häufig nicht der Fall war (siehe Abbildung 30). Ein weiteres Argument gegen die Mobilität der SLB als Ursache des vorgenannten Ergebnisses ist der Fakt, dass auch SLBs erstellt wurden, die den Diffusionskonstanten der Shen-Veröffentlichung entsprachen bzw. diese übertrafen. Auch diese potentiell potenteren SLBs induzierten keine IS, wenn sie mit Jurkat E6.1 inkubiert wurden.

Die verwendete Variante des ICAM1 könnte ein weiterer Grund für die verminderte Ausbildung von Immunologischen Synapsen sein. Der Polymorphismus, der zu der K469E-Form (Rs5498) führt, wurde in Verbindung mit veränderter Spleißaktivität gebracht und wegen veränderter ICAM1-Dimerisierung über einen potentiellen Einfluss auf die LFA-1-Bindung

diskutiert (Iwao *et al.* 2004). Die betroffene Stelle in der mRNA ist nicht konserviert (1548G>A; Schimpanse Guanin, M86848; Maus Adenin, M33036) und es ist daher nicht wahrscheinlich, dass dies einen Einfluss auf das artübergreifende Phänomen der IS hat. Trotzdem wäre eine Überprüfung und eine hypothetische Verbindung der Mutation mit der T-Zell-Aktivierung interessant.

In Publikationen der jüngeren Vergangenheit wurde gezeigt, dass die Konzentration und Stärke von Liganden auf den SLBs entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von T-Zellen hat (Varma *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2008). Dabei ist nicht die Anzahl der Liganden pro Zelle, sondern pro TCR-Cluster entscheidend (Manz *et al.* 2011). Die in dieser Arbeit verwendeten Ligandenkonzentrationen wurden entsprechend den Experimenten von Nye und Groves 2008 sowie Yu *et al.* 2010 gewählt und hätten daher in der Lage gewesen sein müssen, Immunologische Synapsen zu induzieren.

Die Tatsache, dass dies nicht geschehen ist, zeigt auf, dass die bisherigen Grundvoraussetzungen (siehe Kapitel 6.2.1, S. 161) zwar notwendig, jedoch nicht hinreichend für die induzierte Ausbildung einer IS sind.

Die Erkenntnisse von Manz *et al.* 2011 und weitere Beobachtungen weisen allerdings darauf hin, dass die TCR-Mikrocluster – und nicht der cSMAC – die eigentlichen Orte der TCR Signalinitiation und -aufrechterhaltung sind (Yokosuka *et al.* 2005). Es wurden multifokale Immunologische Synapsen beschrieben (Brossard *et al.* 2005), bei denen keine distinkten cSMACs sichtbar sind. Weiterhin wurden T-Zellen beschrieben, bei denen entweder der klassische cSMAC oder multifokale Immunologische Synapsen ausgebildet wurden, je nachdem, welche aktivierende Oberfläche zugrunde lag (Tseng *et al.* 2008). Auch die Beobachtung, dass die Effektorfunktionen durch das Ausbleiben einer Zentralisierung des TCR nicht beeinflusst werden

(Faroudi *et al.* 2003; Purtic *et al.* 2005) deutet auf die Mikrocluster als Auslöser der T-Zell-Funktion hin.

Schließlich gibt es Hinweise darauf, dass der cSMAC ein Ort der Degradierung des TCR ist. Denn die Mikrocluster liegen kolokalisiert mit LBPA (*lysobisphosphatidic acid*), einem Marker für multivesikuläre Körperchen, vor (Varma *et al.* 2006). Außerdem wurde TCR-Ubiquitinylierung in Mikroclustern und bei der Formierung der IS beobachtet (Wiedemann *et al.* 2005; Vardhana *et al.* 2010). Diese Erkenntnisse unterstützen, dass die TCR-Signalinitialisierung in den TCR-Mikroclustern stattfindet (Yokosuka *et al.* 2005; Varma *et al.* 2006), die in Folge dessen internalisiert und abgebaut werden.

Cemerski *et al.* 2008 zeigten, dass die Phosphorylierung im cSMAC und somit die Signalaufrechterhaltung abhängig von der Stärke der Agonisten ist. Bei starken Agonisten ist die Degradierung hoch, sodass keine Phosphorylierung detektierbar ist. Bei schwachen Agonisten hingegen bleibt die Phosphorylierung erkennbar, da der Abbau des TCR verlangsamt ist (Cemerski *et al.* 2008). Die IS oder besser der cSMAC dient in diesem Modell als Ort der Verstärkung von schwachen Antigen signalen und degradiert den TCR als Folge der Aktivierung. Bei zu starken Signalen kann sich demnach kein cSMAC formieren.

Zusammen mit der Beobachtung, dass die Zentralisierung des TCR abhängig von der Mobilität seiner Liganden ist (Hsu *et al.* 2012) und diese Ligandenmobilität wiederum von der Zellphysiologie abhängt, ist es wahrscheinlich, dass die klassische IS eher als ein möglicher Status einer dynamischen adaptierbaren Struktur (Valitutti & Dupre 2010) gesehen werden muss. Die IS würde dabei nur als **ein** mögliches Ergebnis des Zusammenspiels von Ligandenkonzentration, -qualität und -mobilität während der T-Zell-Aktivierung erscheinen.

Da zum einen die IS in der vorliegenden Untersuchung auf einer SLB nicht erfolgreich ausgebildet werden konnte und zum anderen die Bedeutung der physiologischen Relevanz der klassischen IS – im Besonderen auf einer SLB – ohnehin unklar ist, konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die basaleren Mechanismen der TCR-Aktivierung.

Die TCR-Mikrocluster gelten als kleinste gemeinsame Aktivierungseinheit unterschiedlicher T-Zelltypen, und das allgemeine Clusterverhalten des TCR wird als ein Faktor zur Erhöhung der Sensitivität von T-Zellen angesehen (Kumar *et al.* 2011). Deshalb wurde der Schwerpunkt der Untersuchung mehr auf das Clustern des TCR und die Einflüsse des wichtigsten signalvermittelnden Bestandteils CD3 ζ gelegt (siehe Abschnitt 6.3).

6.3 Abhängigkeit des TCR-Clusterverhalten von den ITAM-Domänen, dem Glykolipidspiegel und der Ca^{2+} -Konzentration in unterschiedlichen Aktivierungszuständen

T-Zellen reagieren sehr sensitiv auf ihr Antigen (Irvine *et al.* 2002; Manz *et al.* 2011) obwohl der T-Zell-Rezeptor (TCR) nur eine geringe Affinität zu seinem spezifischen peptidbeladenen MHC-Molekül hat (1-100 μM) (Davis *et al.* 1998). Die Affinität des TCR für antigenische Peptid-MHCs ist nur zehnfach höher als gegenüber den körpereigenen Peptid-MHCs. Wenn man bedenkt, dass Antigen-präsentierende Zellen (APCs) 10^3 - 10^4 -mal mehr körpereigene Peptide (Selbst-Antigen) auf den MHC-Molekülen offerieren als fremde agonistische Peptide (Schamel & Alarcón 2013), erstaunt die Sensitivität der T-Zellen und die geringe Autoimmunitätsrate.

Auf Grund dieser Diskrepanzen werden verschiedene Modelle für die Signalverstärkung durch den TCR diskutiert. Es wird häufig über die Kooperation multipler TCRs in Clustern diskutiert (Varma *et al.* 2006), die z. B. durch konformations-induziertes Clustern (Lillemeier *et al.* 2010), durch kinetische Segregation (Davis & van der Merwe 2006) oder durch lipid-bedingtes Assemblieren (Horejsí 2005) hervorgerufen werden. Es wurde gezeigt, dass T-Zellen erhöhte Antigensensitivität bei erhöhtem TCR-Clustergrad aufweisen (Kumar *et al.* 2011).

Nach einem weiteren Modell wird die TCR-Signaltransduktion in Nanoclustern initiiert; diese nehmen während des Verlaufs der T-Zell-Aktivierung in Größe zu, bis sie als Mikrocluster wahrgenommen werden können (siehe Kapitel 2.2.4). Der cSMAC der Immunologischen Synapse kann also als Endpunkt eines übergeordneten Verstärkungsmechanismus gesehen werden, der durch Clustering vermittelt wird. Die der T-Zell-Aktivierung bzw. deren Verstärkung zugrundeliegende Ursache scheint somit im Clusterverhalten des TCR zu liegen. Dieses und verschiedene Einflüsse darauf wurden im Verlauf dieser Arbeit untersucht.

Als mögliche Einflussfaktoren wurden die Membranbindung und –ablösung der zytoplasmatischen Domänen von CD3 ζ , ionische Einwirkungen auf den TCR, veränderte Lipidkompositionen und die Bedeutung der extrazellulären CD3 ζ -Domäne adressiert.

6.3.1 Struktur und Abhängigkeiten der TCR-Nanocluster

In verschiedenen Modellvorstellungen des nicht-aktivierten TCR wird darüber diskutiert, ob dieser monovalent (ein peptid-MHC-bindend) und monomer (James *et al.* 2011) oder oligovalent (mehrere peptid-MHCs-bindend) und oligomer in Nanoclustern (Schamel & Alarcón 2013) vorliegt. Das Modell der geclusterten, oligomeren TCR-Strukturen, die auch mindestens bivalent sind, ist überzeugend, da es mit seinen Ansätzen der Signalverstärkung gut die beobachtete Sensitivität der T-Zellen bei geringer Affinität für ihre Antigene erklärt. Tatsächlich wurden solche TCR-Nanocluster per Elektronenmikroskopie (Schamel 2005), wie auch per hochauflösendem PALM (*PhotoActivation Localization Microscopy*) (Lillemeier *et al.* 2010; Sherman *et al.* 2011) detektiert. Sie liegen in sogenannten Proteininseln (Lillemeier *et al.* 2006; Lillemeier *et al.* 2010) cholesterol-abhängig vor (Schamel 2005). Die Größe der Nanocluster wird kleiner als 200 nm beschrieben (Schamel *et al.* 2006; Zeng *et al.* 2009) und diese enthalten ungefähr 20 TCR.

Nachweis der Nanocluster

Eine genaue Abgrenzung zwischen Nanoclustern und Mikroclustern des TCR existiert nicht, und die vorgeschlagenen Werte für die Anzahl der Moleküle pro Cluster variieren beträchtlich. Es wird für Mikrocluster eine Anzahl von 11-140 TCR pro Mikrocluster angegeben (Yokosuka *et al.* 2005; Varma *et al.* 2006), wodurch sie sich mit den Nanoclustern überschneiden. Der Einfachheit halber wurden deshalb Cluster der nicht-aktivierten T-Zellen als Nanocluster angesehen und die der aktivierten Zellen als Mikrocluster.

Als Markerprotein für den TCR wurde CD3 ζ -WT-mEGFP gewählt, von dem gezeigt werden konnte, dass es in die endogenen TCR-Cluster gebracht wurde (Abbildung 33) und somit als Vertreter des endogenen TCR angesehen werden konnte.

Mittels CD3 ζ -WT-mEGFP konnten in dieser Arbeit die Nanocluster durch TIRF-Mikroskopie in nicht-aktivierten Jurkat E6.1-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem war ein deutlicher Unterschied zwischen den Nano- und Mikroclustern bei unterschiedlichen Aktivitätszuständen erkennbar (Abbildung 24).

Nanocluster sind unabhängig von den ITAM-Domänen

Für die Ausbildung und Migration von Mikroclustern nach T-Zell-Aktivierung wurde ein Einfluss des Zytoskeletts gezeigt (Campi *et al.* 2005; Kaizuka *et al.* 2007; Ilani *et al.* 2009). Nach der ITAM-Phosphorylierung (siehe Kapitel 2.2.3) werden die Interaktionen mit dem Zytoskelett von Adapterproteinen vermittelt, die an die intrazellulären Bestandteile des TCR binden (Fischer *et al.* 1998).

Unerforscht war bisher jedoch, ob die ITAM-Motive schon vor T-Zell-Aktivierung, z. B. über das Zytoskelett oder durch andere Faktoren, das Clustern des TCR beeinflussen. Zur Untersuchung dessen wurden GFP-markierte ITAM-Deletionsmutanten von CD3 ζ , stellvertretend für alle ITAM-enthaltenden Teile des TCR, generiert. Die Dimerisierung der chimären CD3 ζ -Deletionsmutanten wurde überprüft (Abbildung 32), da bekannt ist, dass der Transport von CD3 ζ zur Oberfläche nur als Dimer erfolgt (Rutledge *et al.* 1992). Die korrekte Lokalisierung der Mutanten auf der Zelloberfläche wurde durch konfokale Mikroskopie und durch den Nachweis auf *Membrane Sheets* bestätigt (Abbildung 34). Daraufhin zeigte sich (Kapitel 5.2.1), dass CD3 ζ mit weniger oder ohne jegliche ITAM-Motive in nicht-aktivierten Zellen als Nanocluster vorlag. Der vergleichbar hohe Clustergrad von Wildtypprotein

und Mutanten ließ auf die Unabhängigkeit der Nanocluster von den ITAMs schließen.

Die Nanocluster der unterschiedlichen CD3 ζ -Varianten könnten allerdings auch von zufälligen morphologischen Ähnlichkeiten herrühren und nicht die Clusterstruktur des TCR widerspiegeln. Dies konnte durch Kollokalisierungsanalysen ausgeschlossen werden. Diese zeigten (Abbildung 35) bei Vergleich mit dem Wildtyp-CD3 ζ , dass die komplette Deletion der CD3 ζ -ITAM-Motive zu keinerlei Veränderung führte.

Um den Einfluss der CD3 ζ -ITAM-Deletionsmutanten auf die Gesamtzahl der zellulär vorhandenen ITAMs abschätzen zu können muss man zwei Punkte berücksichtigen: Erstens den Fakt, dass 6 von 10 ITAM-Motiven des TCRs im CD3 ζ -Homodimer enthalten sind. Und als zweiten Punkt das Verhältnis von endogenem zu rekombinanten CD3 ζ .

Der zweite Punkt konnte experimentell nur abgeschätzt werden, da in der Immunfluoreszenz nicht funktionierende Anti-TCR-Antikörper es unmöglich machten über ein präzises Testsystem (antikörper-basiert) den Vergleich vom Gesamt-CD3 ζ -Level mit dem rekombinanten CD3 ζ -mEGFP-Level anzustellen. Trotzdem konnte ein Hinweis auf die Größe des Einflusses der Deletionsmutanten auf die gesamte TCR-Population durch die *Western Blot* Analysen gewonnen werden (Abbildung 32). Diese zeigten, dass hauptsächlich Homodimere des CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP in den transfizierten Zellen vorlagen und folglich verhältnismäßig wenig endogenes CD3 ζ an der observierten TCR-Population beteiligt war; bei höherem Anteil an endogenem CD3 ζ hätten nämlich mehr CD3 ζ -WT/CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP Heterodimere vorhanden sein müssen. Der im Vergleich zum endogenen CD3 ζ festgestellte Überfluss an rekombinanten CD3 ζ war wahrscheinlich durch den viralen Promotoren des Plasmids bedingt, der das Expressionslevel stark erhöhte.

Als Ergebnis aus der Abschätzung ergab sich, dass die Deletion der CD3 ζ -ITAM-Motive also erheblichen Einfluss auf die Netto-ITAM-Anzahl der TCRs hatte.

Wegen des Ausbleibens eines Effektes auf die Nanocluster trotz massiv verringerter ITAM-Anzahl ist es unwahrscheinlich, dass ITAM-assoziierte Proteine, wie z. B. die des Zytoskeletts, für das Clustern von nicht-aktiviertem TCR verantwortlich sind. Daher musste es andere Faktoren geben, die als mögliche Einflussgeber in Frage kamen.

Als solche sind z. B. Assoziationen des TCR mit Cholesterol- (Schamel 2005) und GM1-enthaltenden (Janes *et al.* 1999; Thomas *et al.* 2003) Bereichen der Plasmamembran bekannt. Die Transmembrandomäne bzw. deren Umfeld als Einflussgeber bei der Nanoclusterbildung erscheint auch deshalb wahrscheinlich, da von Kumar *et al.* 2011 gezeigt wurde, dass eine Punktmutation im Transmembranteil von CD3 ζ zu veränderter TCR-Anzahl pro Nanocluster führt.

Die Lipidumgebung beeinflusst die Nanocluster

Für aktivierte T-Zellen wurde gezeigt, dass sich der TCR mit GM1 sowohl in detergenz-resistenten als auch in detergenz-löslichen Membranfraktionen befindet (Thomas *et al.* 2003). Weiterhin wurden für den TCR beschrieben, dass er in cholesterol-reichen Proteininseln enthalten ist (Lillemeier *et al.* 2006), und dass TCR-Cluster durch Cholesteroldepletion verkleinert bzw. aufgelöst werden (Schamel 2005). Die Verringerung von Glycosphingolipiden (GSLs) durch Inhibition der Glukosylceramidsynthese führt zur verminderten T-Zell-Aktivierung (Zhu *et al.* 2011). Diese Erkenntnisse und die weiter oben diskutierten Zusammenhänge zwischen Größe von TCR-Clustern und Aktivierungsgrad und –sensitivität legen es nahe, den Einfluss von Glykolipiden auf die TCR-Cluster zu untersuchen.

Wie bereits in Kapitel 6.1.1 beschrieben, können Glykolipidlevel mit Hilfe des GLTP in nativen Membranpräparationen direkt und definiert verändert werden. Und über die Modulation der Glykolipidlevel können Eigenschaften von Membranproteinen verändert werden, wie am Beispiel von SNAP-25-Clustern gezeigt wurde (siehe Abbildung 40).

Die Versuche mit dem TCR zeigten (Abbildung 41A,B), dass die Verringerung der Glykolipidlevel zu einer Homogenisierung des TCR-Signals führen und folglich die Nanocluster in ihrer Größe und Struktur beeinflusst werden. Dieser lipidabhängige Effekt könnte daher rühren, dass zytoplasmatische Domänen der CD3-Molekülen mit der Plasmamembran assoziiert sind (Aivazian & Stern 2000; Sigalov *et al.* 2006; Xu *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2011; Deford-Watts *et al.* 2011). Bei Entfernung der interagierenden Lipide durch GLTP wäre die Stabilität der Nanocluster beeinträchtigt und als Folge dessen würde sich das Clustern vermindern.

Anstelle der spezifischen Bindung an die Lipide wäre als zweite Möglichkeit auch denkbar, dass die Lipide Umgebungsräume für die Transmembrandomänen darstellen, die das Clustern begünstigen. Bei Depletion der Lipide würde diese Packung verringert bzw. zerstört und somit auch der Grad des TCR-Clusterns vermindert. Zur Aufklärung dieser Frage wurde erneut die CD3 ζ - Δ ITAM1-3-mEGFP Mutante verwendet, die nicht über intrazelluläre Lipidinteraktionsmotive verfügt. Es zeigte sich, dass CD3 ζ auch ohne intrazelluläre Domäne auf die Glykolipidabsenkung in der Membran in gleicher Stärke reagiert (Abbildung 41C,D).

Dies deutet auf die zweite der oben genannten Hypothesen hin und wird von den Beobachtungen von Schamel *et al.* 2005 unterstützt, in denen sich TCR-Nanocluster bei cholesterol-depletion verkleinern. Der Clustergrad der Nanocluster ist von der Lipidkomposition abhängig, und zwar über Mechanismen, die unabhängig von der Interaktion zwischen intrazellulären CD3-Domänen mit Lipiden sind. Die geringe Stärke des Effektes von GLTP

könnte auf eine hohe Packungsdichte der Glykolipide und somit schlechte Zugänglichkeit für das eingesetzte GLTP zurück zu führen sein (Nylund & Mattjus 2005; Lauria *et al.* 2013).

Im Widerspruch zu den oben genannten Ergebnissen war die Unabhängigkeit des TCR-Clusters von dem nativen GM1-Level in T-Zellen (Abbildung 42A). Dies könnte dafür sprechen, dass die Veränderung der Glykolipidspiegel in lebenden Zellen nur eine untergeordnete Funktion bei der Regulation des TCR-Clusters spielt. Denn auch aktivierte T-Zellen wiesen trotz stärkerem TCR-Clustergrad (in Mikroclustern) keine erhöhten GM1-Spiegel auf (Abbildung 42B).

Ein nächster Schritt für weitere Untersuchungen könnte sein, wie bei Zhu *et al.* 2011 den Glukosylceramidsynthase-Inhibitor Genz-122346 bei Zellen anzuwenden und anschließend die daraus generierten *Membrane Sheets* mit Hilfe von GLTP mit unterschiedlichen Glykolipiden zu rekonstituieren. Durch ein solches Vorgehen könnten in definierter Weise die genauen Glykolipide, die bei dem TCR-Nanoclustern beteiligt sind, ausfindig gemacht werden und ihre jeweiligen Anteile am Clustergrad des TCR bestimmt werden.

Ladungseinfluss von Ca^{2+} auf die Nanoclustergröße

Es ist bekannt, dass bei T-Zell-Aktivierung zeitnah ein Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle stattfindet (Huse *et al.* 2007) und dass Ca^{2+} mit TCR-Mikroclustern (Shi *et al.* 2013) und der IS (Quintana *et al.* 2011) kolokalisiert. Ca^{2+} ist beteiligt an der Ablösung der zytoplasmatischen Domänen von CD3 (Shi *et al.* 2013), die über basische Sequenzen (*Basic Rich Sequences* = BRS) an negativ geladene Lipide gebunden sind (Aivazian & Stern 2000; Kuhns & Davis 2008; Xu *et al.* 2008; Deford-Watts *et al.* 2011). Eine weitere Beteiligung von Ca^{2+} bei der allgemeinen Membranproteinorganisation wurde von Zilly *et al.* 2011 beschrieben, bei der durch elektrostatische Effekte das Wachstum und die Größe unterschiedlicher Proteincluster beeinflusst wurde.

In Hinblick auf diese Erkenntnisse stellte sich die Frage, ob auch das Clustern des TCR entweder über die zytoplasmatischen Domänen von CD3 oder über davon unabhängige, elektrostatische Wechselwirkungen des restlichen Rezeptorkomplexes beeinflusst wird.

Zur Überprüfung dessen wurde in der vorliegenden Arbeit erneut die Wildtypvariante und die ITAM-Deletionsmutante von CD3 ζ verwendet, um zwischen eventuellen Einflüssen des Ca^{2+} durch einen der genannten Mechanismen unterscheiden zu können (Abbildung 36). Im Ergebnis waren weder bei der Wildtypvariante des Proteins noch bei der deletierten Form relevante Unterschiede zwischen Ca^{2+} -behandelten und -unbehandelten *Membrane Sheets* erkennbar. Zwar war bei dem wildtypischen Protein – im Gegensatz zur deletierten Form – eine Tendenz zur Erhöhung des Clustergrades zu erkennen, jedoch war die Schwankungsbreite der Ergebnisse so groß, dass keine sichere Aussage getroffen werden konnte. Falls Ca^{2+} -induziertes Abklappen der zytoplasmatischen Domänen von CD3 ζ für den leichten Anstieg des Clustergrades verantwortlich war, so minimierten die noch vorhandenen zytoplasmatischen Domänen von CD3 ϵ

wahrscheinlich den Effekt soweit, dass er sich nicht zweifelsfrei detektieren ließ.

Ein elektrostatisch-vermittelter Clustereffekt des TCR trat nicht auf. Grund hierfür könnte sein, dass der TCR intrazellulär nicht ausreichend negativ geladen sein könnte, um solche Effekte aufzuweisen. Ebenso könnte die erhebliche Größe des TCR von 450 kDa die mutmaßlich geringen Wechselwirkungen durch sterische Hinderung stärker unterbinden als bei vergleichsweise kleinen Proteinen mit negativer Nettoladung wie SNAP-25 (Zilly *et al.* 2011).

Im Ergebnis zeigten die Betrachtungen der intrinsischen physikalischen Eigenschaften von CD3 ζ , dass der Clustergrad der TCR-Nanocluster **nicht** von Ca²⁺ modifiziert wird.

6.3.2 TCR-Mikrocluster

Innerhalb von Sekunden nach der Aktivierung bilden sich in T-Zellen größere TCR-Cluster aus, die mit ZAP70 (*Zeta chain-Associated Protein kinase 70 kDa*), Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), LAT (*Linker for Activation of T cells*) und SLP76 (*SH2-domain containing Leucocyte Protein of 76 kDa*) assoziiert sind (Bunnell *et al.* 2001). Bei der Bildung dieser sogenannten Mikrocluster ist das Aktinzytoskelett beteiligt (Campi *et al.* 2005; Varma *et al.* 2006; Nguyen *et al.* 2008), das über Vav mit dem TCR verbunden ist (Fischer *et al.* 1998). Die Mikrocluster wandern zentripetal mit dem retrograden Fluss des Aktin, bis sie unter definierten Voraussetzungen im aktinfreien cSMAC konvergieren (Yokosuka *et al.* 2005; Campi *et al.* 2005). Die Anzahl der in Mikroclustern enthaltenen TCRs ist nicht eindeutig definiert; es wird von 11-17 (Varma *et al.* 2006) bzw. 40-150 CD3 ζ pro TCR-Mikrocluster (Yokosuka *et al.* 2005) berichtet. Die TCR-Mikrocluster werden als die bei der Signalinitiation beteiligten Strukturen der T-Zell-Aktivierung angesehen (Campi *et al.* 2005).

Da sich die Mikrocluster aus den oben diskutierten Nanoclustern entwickeln und die Größe der Nanocluster ebenfalls mit der T-Zell-Aktivierung assoziiert ist (siehe Kapitel 2.2.4), wurden im Folgenden die Untersuchungen zu dem Clusterverhalten auf die Mikrocluster ausgeweitet.

Mikrocluster bilden sich ITAM-unabhängig

Die Ausbildung von TCR-Mikroclustern wurde in dieser Arbeit sowohl auf immobilen als auch auf mobilen Oberflächen direkt in T-Zellen (durch CD3 ζ -mEGFP) oder indirekt durch an die SLB-gebundene Antikörper (Streptavidin- α TCR) nachgewiesen (Kapitel 5.1.1 bzw. Kapitel 5.1.2). Es ist bekannt, dass die ITAM-Motive der CD3-Proteine die Schlüsselstellen der Signalweiterleitung bilden und dass sich bei T-Zell-Aktivierung die zytoplasmatischen Domänen von CD3 von der Plasmamembran ablösen. Die ITAMs sind funktionell redundant in Hinsicht auf die generelle Signaltransduktion (Irving *et al.* 1993), aber ihre Deletion bewirkt eine proportionale Verminderung der positiven Selektion in der T-Zell-Reifung. Deshalb nehmen Love und Hayes an, dass die ITAMs kollektiv das Aktivierungssignal verstärken (Love & Hayes 2010).

Die Annahme einer ITAM-abhängigen Verstärkung der Aktivierung, die ebenso von dem TCR-Clustergrad abhängt, impliziert eine Verbindung beider im Zustand der T-Zell-Aktivierung.

Bei Untersuchungen zu diesem Thema zeigten sowohl das wildtypische CD3 ζ als auch die ITAM-deletierte Form einen vergleichbaren Anstieg des Clustergrades nach Aktivierung (Abbildung 36C,D und Abbildung 41C,D). Eine Erhöhung des Clustergrades war zumindest für die Wildtypform erwartungsgemäß, da sich der Theorie nach die Nanocluster vergrößern, bis sie als Mikroclustern definiert werden. Das identische Verhalten beider Proteinformen deutet nun darauf hin, dass der Mechanismus, der an der Vergrößerung der TCR-Cluster beteiligt ist, nicht oder nur zu geringen Teilen ITAM-abhängig ist. Um dies weitreichender zu adressieren, müssten T-Zellen

ohne endogenen TCR verwendet werden und mit künstlichem TCR ohne jegliche ITAMs rekonstituiert werden.

Trotzdem war es unerwartet, dass solch ein massiver Eingriff in die CD3 ζ -Struktur wirkungslos blieb; das machte es lohnenswert, andere Einflussfaktoren auf die Akkumulation von TCR-Mikroclustern zu untersuchen. Als solche waren z. B. konformationsvermittelte Interaktionen mit Proteinen innerhalb der Membran, lipid-vermitteltes Clustern oder Interaktionen durch Ionen via elektrostatischer Wechselwirkungen denkbar.

Die Lipidumgebung wechselwirkt mit den TCR-Mikroclustern

Der TCR und assoziierte Proteine sind mit bestimmten Lipidumfeldern assoziiert worden (Xavier & Seed 1999; Thomas *et al.* 2003; Balagopalan *et al.* 2007). In neuerer Literatur wurde sogar beschrieben, dass in TCR-Mikroclustern die lokale Dichte von Phosphatidylserin (PS) verringert ist (Gagnon *et al.* 2012). Deshalb wurden, wie oben beschrieben, Untersuchungen zur Veränderung der Glykolipidlevel in nativen Membranen durchgeführt, die für TCR-Nanocluster zeigten, dass die Verminderung der Glykolipidlevel den Clustergrad des TCRs verringert.

Im Gegensatz zu den Nanoclustern sind in den Mikroclustern die zytoplasmatischen Domänen der CD3-Moleküle nicht mehr an Membranlipide gebunden, sondern liegen frei zugänglich im Zytoplasma vor. Dies könnte dazu führen, dass Lipide, die vorher durch die Interaktion mit den zytoplasmatischen Domänen stabilisiert wurden, leichter beeinflussbar sind, und dass das Lipidumfeld des TCR bei GLTP-Behandlung massiver verändert würde. Dadurch hätte ein stärkerer Effekt auf den Clustergrad der Mikrocluster als bei den Nanoclustern sichtbar sein sollen, was jedoch nicht der Fall war (Abbildung 41 und Abbildung 42).

Tatsächlich aber scheint die Verringerung des Clustergrades von Mikroclustern sogar etwas schwächer als bei den Nanoclustern gewesen zu

sein. Wahrscheinlich hatten in den Experimenten auf den *Membrane Sheets* verbliebene Reste des Zytoskeletts die Mikrocluster in ihrer Form stabilisiert.

Interessant in Bezug auf die Veröffentlichung von Gagnon *et al.* 2012 (siehe oben) wäre auch die Anwendung eines PS-verändernden Proteins auf die TCR-Mikrocluster des TCR, da damit deren Beobachtung genauer adressiert werden könnte.

Nach den Erkenntnissen, die aus der Beeinflussung der Glykolipidlevel in nicht-aktivierten (TCR-Nanocluster) und aktivierten T-Zellen (TCR-Mikrocluster) gewonnen wurden, scheint es, als ob die Lipide nur auf den Clustergrad des TCR reagieren und nicht umgekehrt. Auch eventuelle Veränderungen der totalen Glykolipidlevel bei T-Zell-Aktivierung können nur geringeren oder lokalen Ausmaßes zu sein, da gezeigt wurde (Abbildung 42), dass diese in *Membrane Sheets* aktivierter T-Zellen nicht verändert sind.

Trotzdem wäre es sehr interessant, weitere Lipidspezies auf ihre physische Nähe und Interaktionen mit dem TCR zu überprüfen. Denkbar wäre die Fütterung mit chemisch minimal veränderten Vorläuferlipiden, die nach Einbau in die zellulären Membranen über eine chemische Reaktion an Fluorophore gekoppelt werden können (Thiele *et al.* 2012). Damit könnten dann die Lokalisierungen verschiedener Lipide mit dem TCR in unterschiedlichen Aktivierungsstadien betrachtet werden.

Ladungseinfluss von Ca^{2+} auf Mikrocluster

Shi *et al.* haben gezeigt, dass Ca^{2+} -Mikrodomänen mit dem TCR nach T-Zell-Aktivierung kolokalisieren und die Phosphorylierung von ITAM-Tyrosinen verstärken, indem sie die Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von CD3 ϵ und CD3 ζ mit der Plasmamembran vermindern (Shi *et al.* 2013). Nachdem die ITAM-deletierte Form des CD3 ζ keinen Einfluss von Ca^{2+} auf das Clusterverhalten des TCR gezeigt hatte (siehe Diskussion S.178), war es unwahrscheinlich, Effekte auf aktivierten TCR zu beobachten. Wie erwartet

war der Clustergrad des TCR bei aktivierten T-Zellen höher als bei nicht-aktivierten. Ein cluster-vergrößernder Effekt durch Ca^{2+} auf den nativen Plasmamembranpräparationen war nicht zu beobachten (Abbildung 36).

Zusammengenommen unterstützen die Ergebnisse von Nano- und Mikroclustern die Rolle von Ca^{2+} als lokalem Unterstützer und Erhalter von Konformations- und Aggregatzuständen, wie sie auch von Shi *et al.* beschrieben wurden (Shi *et al.* 2013). Eventuell auftretende elektrostatische Effekte des Ca^{2+} auf die Proteine des TCR sind vernachlässigbar klein.

6.3.3 Die Bedeutung der extrazellulären CD3 ζ -Domäne im TCR

Die extrazelluläre Domäne von CD3 ζ ist in den Säugetieren hochkonserviert und spielt bei der T-Zell-Signaltransduktion eine wichtige Rolle (Bolliger *et al.* 1997). Es wurde bereits erwähnt, dass es bei einer Vergrößerung des extrazellulären Teils bei Peptid-MHC-Bindung zu einer Hyperaktivierung des TCR kommt. Außerdem wurde beschrieben, dass die Assemblierung des TCR und dadurch sein Transport zur Zelloberfläche vermindert und bei zu starker Vergrößerung des extrazellulären Teils komplett unterdrückt wird (Minguet *et al.* 2008b). Diskutiert wird eine Funktion der extrazellulären CD3-Domänen als Teile eines strukturellen Sensors für die Weiterleitung von auftretenden Kräften am TCR $\alpha\beta$, die bei der Bindung von Peptid-MHCs an den TCR auftreten würden (Kim *et al.* 2012)(siehe Kapitel 2.2.5, S. 38).

Für CD3 ζ wurde in Hinblick auf das TCR-Clustern und somit auf die erleichterte Signalweiterleitung eine Beteiligung an einem solchen strukturellen mechanosensorischen Komplex untersucht. Es wurde ein chimäres CD3 ζ -Protein generiert, das extrazellulär mit einem mEGFP fusioniert ist. Die dadurch stark vergrößerte extrazelluläre Domäne zeigte einen Phänotyp mit speichenartigen, intrazellulären Strukturen (Abbildung 43) und bestätigte die erwähnte überwiegende Retention des TCR in intrazellulären Kompartimenten. Auch die uniforme Verteilung in der

Plasmamembran deutete auf eine anormale Zusammensetzung des TCR hin. Daher diente dieser Phänotyp in dieser Arbeit als Kontrolle für fehlerhafte TCR-Assemblierung.

Weitergehende Untersuchungen (Abbildung 45) zeigten bei schrittweiser Deletion der extrazellulären Aminosäuren eine stärker punktierte Struktur auf den *Membrane Sheets* und dadurch einen erhöhten Clustergrad. Dabei könnte es sich um eine verminderte Assemblierung des TCR und somit Retention im ER oder Golgi handeln, wie bei Johansson *et al.* 1999 diskutiert. Dagegen spricht jedoch, dass eine Kolokalisierung mit endozytiertem Sulforhodamin bestand (Abbildung 46); außerdem waren auch in konfokalen 3D-Stapelaufnahmen (nicht gezeigt) vesikelartige Strukturen erkennbar und nicht die in Abbildung 43 gezeigten vernetzten bzw. speichenartigen Strukturen. Gegen die Lokalisierung der CD3 ζ -Deletionsmutante in dem lysosomalen Kompartiment spricht die zum Zytosol hin gerichtete Orientierung des mEGFP (Abbildung 46C). Bei lysosomaler Degradierung hätte das mEGFP im Lumen der Lysosomen abgeschirmt vorliegen müssen.

Die Identifizierung des Kompartiments, in dem sich die CD3 ζ - Δ EC-Mutante befindet, konnte per Immunfluoreszenz nicht aussagekräftig beantwortet werden. Es erscheint plausibel, dass der TCR wegen des mutierten CD3 ζ über Mechanoaktivierung unmittelbar nach Erreichen der Zelloberfläche internalisiert wird. Dieser Gedanke wird im Unterkapitel über die Mechanoaktivierung ausführlich weiter diskutiert (siehe S. 185ff.).

Die veränderte Lokalisierung des TCR bei Deletion des extrazellulären Teils von CD3 ζ konnte nur durch genetische Manipulation gezeigt werden. Um ein unmittelbarer Bild der Funktion des extrazellulären CD3 ζ -Teils in seinem physiologischen Kontext zu bekommen, sollte dieser möglichst in lebenden Zellen proteolytisch abgespalten werden. Dazu wurde ein rekombinantes CD3 ζ hergestellt, bei dem die extrazelluläre Domäne gegen eine

Schnittstellensequenz einer spezifischen Protease ausgetauscht war (CD3 ζ -EC(TEV)-mEGFP, siehe Abbildung 44). Da es jedoch nach Behandlung mit dieser (TEV-)Protease nicht zur Abtrennung des extrazellulären Teils kam, ist es wahrscheinlich, dass die Zugänglichkeit für die Protease nicht ausreichend war, da CD3 ζ im TCR eingebettet ist (Minguet *et al.* 2008a).

Immerhin konnte durch den Austausch der extrazellulären Aminosäuren nachgewiesen werden, dass die Länge der extrazellulären Domäne und nicht die Sequenzabfolge entscheidend für das Verweilen des TCR in der Plasmamembran ist. Außerdem ist bemerkenswert, dass die CD3 ζ -EC(TEV)-Mutante, bei der unter anderem das Lysin an Position 9 zu Glycin ausgetauscht ist, trotzdem in der Lage war, Mikrocluster auszubilden (Abbildung 44). Dies steht im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von Bolliger *et al.* 1999, nach denen genau dieser Austausch zu einer starken Verminderung der Signalantwort der T-Zellen führt. Für weitergehende Experimente scheint es lohnenswert, die extrazelluläre Domäne von CD3 ζ , eventuell durch photoinduziertes Spalten einer Bindung, in lebenden T-Zellen abzutrennen und den unmittelbaren Effekt auf die Lokalisierung zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob die intrazellulären Signalmotive von CD3 ζ an der veränderten Lokalisierung beteiligt sind. Dazu wurde eine Mutante generiert, bei der sowohl der extrazelluläre als auch der intrazelluläre Teil deletiert war (Abbildung 47). Der Phänotyp veränderte sich jedoch nicht, was auf die Unabhängigkeit von ITAM-abhängigen Signalwegen schließen lässt.

Mechanoaktivierung als mögliche Erklärung für die veränderte Lokalisierung durch Internalisierung des TCR

Es ist bekannt, dass der extrazelluläre Teil von CD3 ζ im TCR eingebettet vorliegt. Dieser Teil ist in nicht-aktiviertem Zustand nicht von Antikörpern detektierbar, wird aber nach längerer TCR-Stimulation zugänglich (Minguet

et al. 2008a). Dies deutet auf Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen des TCR hin. Unterstützt wird diese Annahme durch die superkompetente Signaltransduktion bei Vergrößerung der extrazellulären CD3 ζ -Domäne (Minguet *et al.* 2008b), da durch den vergrößerten Hebel kleine Kräfte zu massiven konformationellen Veränderungen führen sollten. Solche mechanischen Signalweiterleitungsmechanismen wurden von Risueño *et al.* vorgeschlagen; sie sollen eine kolbenartige Bewegung von CD3 γ und CD3 ϵ beinhalten welche externe Konformationsänderungen in das Zellinnere zu den signalweiterleitenden Domänen übertragen (Risueño *et al.* 2008). Denkbar dafür sind tangentielle Kräfte, die vom TCR $\alpha\beta$ -Heterodimer nach Peptid-MHC-Bindung auf CD3 ausgeübt werden (Blanco & Alarcón 2012).

Für die intrazellulären Domänen von CD3 wurde schon gezeigt (siehe Kapitel 6.3.1, S. 178), dass sie als Resultat oder als Beteiligung der T-Zell-Aktivierung ihre Konformation verändern und sich von der Plasmamembran ablösen (Aivazian & Stern 2000; Kuhns & Davis 2008; Xu *et al.* 2008; Deford-Watts *et al.* 2011; Shi *et al.* 2013). Außerdem ist bekannt, dass der TCR als Folge der Aktivierung internalisiert wird (Essen *et al.* 2004; Balagopalan *et al.* 2009) und phosphoryliertes CD3 ζ in endosomalen Kompartimenten akkumuliert wird (Yudushkin & Vale 2010). Intrazelluläre, vesikuläre Lokalisierung von CD3 ζ wurde bei Zerstörung von Phospholipidbindestellen beobachtet (Deford-Watts *et al.* 2011). Diese bewirkte vermutlich die Ablösung der intrazellulären Domänen von der Plasmamembran, verstärkte so die ITAM-Phosphorylierung und führte zu T-Zell-Aktivierung (Shi *et al.* 2013).

Auf diesen Annahmen aufbauend scheint es wahrscheinlich, dass die extrazelluläre Domäne von CD3 ζ durch Interaktion mit anderen Teilen des TCR bei Peptid-MHC-Bindung eine mechanische Kraft erfährt. Ein Abklappen des extrazellulären Teils von CD3 ζ ist denkbar und wird von den Ergebnissen von Minguet *et al.* gedeckt, bei denen Antikörperzugänglichkeit erst nach Aktivierung gegeben war (Minguet *et al.* 2008a).

Meine Untersuchungsergebnisse zur Deletion der extrazellulären Aminosäuren von CD3 ζ sowie die oben genannten Erkenntnisse aus der Literatur führen mich zu der Hypothese, dass bei der CD3 ζ - Δ EC-Mutante die Stabilisierung durch die Einbettung in den TCR nicht aufrecht erhalten wird. Dadurch würde es zu Konformationsänderungen der restlichen Teile des CD3 ζ kommen, die wiederum die weiteren signaltransduzierenden Bereiche des TCR beeinflussen und einen aktivierten Zustand induzieren. Direkt im Anschluss an die artifizielle, antigen-unabhängige Aktivierung käme es zur Internalisierung des TCR und zu einem Vesikel-phänotyp ähnlich dem von Deford-Watts *et al.* 2011. Diese Annahmen wären im Einklang mit der von Li *et al.* 2010 gezeigten Aktivierung von T-Zellen durch mechanische Kräfte und würden eine Rolle des TCR als Mechanosensor unterstützen (Ma & Finkel 2010), bei dem die extrazelluläre Domäne von CD3 ζ maßgeblich am Aktivierungsprozess beteiligt ist.

6.3.4 Zusammenfassung und Modell der TCR-Aktivierung

Der T-Zell-Rezeptor ist ein wichtiges Protein der adaptiven Immunantwort. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist noch nicht vollständig aufgeklärt, in welcher Stöchiometrie er vorliegt (Schamel & Alarcón 2013). Durch die Diskrepanz zwischen geringer Antigen-Affinität des TCR (Davis *et al.* 1998) und der hohen Sensitivität der T-Zellen für ihr spezifisches antigenisches Peptid-MHC (Irvine *et al.* 2002; Manz *et al.* 2011) kam die Frage nach der Signalinitiation und -amplifikation auf. Die hier präsentierte Arbeit behandelt Aspekte der T-Zell-Aktivierung und verfeinert bereits vorhandene Modelle durch neue Erkenntnisse.

In nicht aktivierten T-Zellen liegt der TCR in Form von Nanoclustern vor, die durch Interaktion und Kooperation zwischen einzelnen Rezeptoren die Sensitivität für die Reaktion auf Peptid-MHC-Komplexe erhöhen (Schamel & Alarcón 2013). Durch die Untersuchung von Deletionsmutanten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Nanocluster unabhängig von intrazellulären CD3-Bestandteilen gebildet werden. Hinsichtlich des Einflusses der Lipidumgebung (Schamel 2005; Lillemeier *et al.* 2006) zeigte sich, dass eine Verringerung der Glykolipidlevel nativer Membranen den Clustergrad der Nanocluster unabhängig von intrazellulären CD3 ζ -Domänen vermindert.

Weiterhin konnten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem TCR und Ca²⁺-Ionen als verantwortlicher Faktor für die Vergrößerung von Nanoclustern ausgeschlossen werden.

Auch bei den Clustern der aktivierten T-Zellen, den Mikroclustern, zeigten sich ähnliche Auswirkungen bei Manipulation von nativen Membranen. Die Mechanismen, die an der Mikroclusterbildung beteiligt sind, wurden nicht durch die intrazellulären ITAM-Motive von CD3 ζ gesteuert. Diese Motive

waren bei der Glykolipidbeeinflussung der Mikroclustergröße unbedeutend. Wie bei den Nanoclustern verringerte sich der Clustergrad der Mikrocluster bei Absenkung der Glykolipidlevel in nativen Membranen. Daraus kann man schlussfolgern, dass der zugrunde liegende Mechanismus eher genereller als spezifischer Natur ist und nicht auf unterschiedliche Aktivierungsstadien des TCR einwirkt. Ebenso wie bei den Nanoclustern sind die elektrostatischen Wechselwirkungen unbedeutend für die Größe von Mikroclustern.

Für den eigentlichen Vorgang der TCR-Aktivierung durch Peptid-MHC-Bindung wurden einige Hinweise auf Mechanoaktivierung als möglichem Auslöse- und Verstärkungsmechanismus gewonnen. Dafür sprach, dass die Länge der extrazellulären Domäne von CD3 ζ und nicht ihre Aminosäurenabfolge für die Internalisierung verantwortlich war; was darauf schließen lässt, dass sie auch an der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist.

Als Zusammenfassung der Teilmodelle aus Literatur und den oben beschriebenen Erkenntnissen aus den Versuchen dieser Arbeit ergibt sich für mich folgendes Modell der T-Zell-Aktivierung, welches verschiedene Teilmodelle miteinander kombiniert:

Der TCR setzt sich aus den TCR $\alpha\beta$ -, CD3 $\epsilon\delta$ -, CD3 $\epsilon\gamma$ - und CD3 $\zeta\zeta$ -Dimeren zusammen. Dabei sind die extrazellulären Domänen des CD3 $\zeta\zeta$ -Homodimers im restlichen TCR eingebettet (Schamel 2005). Mehrere TCRs bilden in nicht-aktiven T-Zellen Nanocluster aus, die kooperative Konformationsveränderungen bei Peptid-MHC-Bindung erfahren (Martinez-Martin *et al.* 2009). Diese Kooperationen erhöhen die „Begierde“ der TCR-Nanocluster (Schamel & Alarcón 2013) und verstärken so die Sensitivität für Peptid-MHC-Moleküle. Als neue Erkenntnis aus dieser Arbeit ergibt sich, dass Nanocluster durch Interaktionen der Transmembranregionen gebildet werden. Dies wird durch andere Forschungsergebnisse bestätigt, wonach

der TCR innerhalb der Doppellipidschicht durch ionische Wechselwirkungen seiner Dimere zusammengehalten wird (Blumberg *et al.* 1990; Cosson *et al.* 1991; Call *et al.* 2002) und eine einzelne Punktmutation in der Transmembrandomäne von CD3 ζ die TCR-Anzahl pro Nanocluster verringert (Kumar *et al.* 2011).

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind für den TCR Einflüsse auf das Clusterverhalten durch elektrostatische Wechselwirkungen der zytoplasmatischen CD3-Domänen auszuschließen. Vielmehr binden die intrazellulären Domänen über basische Sequenzen (BRS) an anionische Lipide der Plasmamembran und Tyrosinreste inserieren in den hydrophoben Kern der Membran (Sigalov *et al.* 2006; Xu *et al.* 2008; Shi *et al.* 2013). Diese Bindung erschwert die unspezifische Aktivierung des TCR und dient als Sicherungsmechanismus (Kuhns & Davis 2008).

Die Nanocluster haben ein spezialisiertes Umfeld in sogenannten Proteininseln (Lillemeier *et al.* 2006). Diese werden auch durch ihre Lipidzusammensetzung definiert und reagieren in der Folge sensitiv auf Veränderung von Lipidleveln (Schamel 2005)(siehe Kapitel 6.3.1, S. 175). Die Nanocluster stellen durch ihre Möglichkeit zur kooperativen Konformationsänderung präassemblierte TCR-Plattformen dar, welche die T-Zell-Aktivierung erleichtern (Schamel *et al.* 2006).

Bei der eigentlichen T-Zell-Aktivierung bindet ein Peptid-MHC-Komplex an einen TCR. Durch seriell Binden und Lösen des Peptid-MHC-Komplexes kommt es zur Vervielfachung des Signals (Valitutti *et al.* 1995; Huang *et al.* 2010). Bei diesem Prozess treten mechanische Kräfte wie z. B. tangential Kräfte von TCR $\alpha\beta$ auf CD3 (Blanco & Alarcón 2012) auf, die in eine Rezeptordeformation (Ma & Finkel 2010) resultieren. Dadurch fungiert der TCR als Mechanosensor (Kim *et al.* 2009). Die eigenen Ergebnisse weisen in Verbindung mit denen von Minguet *et al.* (Minguet *et al.* 2008a) auf eine konformationelle Veränderung von CD3 ζ wie z. B. ein Abklappen in dem

kurzen extrazellulären Teil hin. Die extrazellulär initiierte Konformationsänderung führt über die CD3 ζ -Transmembrandomäne (Kumar *et al.* 2011) zu Veränderungen, die benachbarte Teile des TCR (Martinez-Martin *et al.* 2009), sowie des ganzen Nanoclusters in einen leichter aktivierbaren Zustand versetzen.

Als weitere Konsequenz aus den extrazellulär einwirkenden Kräften werden die Membranassoziationen der intrazellulären Domänen von CD3 ζ und CD3 ϵ destabilisiert; die intrazellulären Domänen werden dadurch für Kinasen zugänglich (Xu *et al.* 2008; Shi *et al.* 2013). Diese offene Konformation ermöglicht bzw. erleichtert zumindest die Phosphorylierung der ITAMs. Die anschließende Phosphorylierung der 10 ITAM-Motive des TCR erfolgt sequenziell (Mukhopadhyay *et al.* 2013).

Als Antwort auf die Bindung von nur einem Peptid-MHC-Komplex an einen TCR kommt es zum Ca²⁺-Signal (Irvine *et al.* 2002). Das freigesetzte bzw. eingeströmte Ca²⁺ erleichtert lokal das weitere Ablösen von intrazellulären CD3-Bestandteilen benachbarter TCRs im Nanocluster. Dies führt auch dort zu verstärkter bzw. erleichterter Phosphorylierung (Shi *et al.* 2013).

Bei anhaltendem Signal durch vermehrte oder erneute Antigenbindung wird Zytoskeletts rekrutiert. Dieser Vorgang bewirkt eine aktin-abhängige Vergrößerung der TCR-Cluster (Bunnell *et al.* 2002; Kaizuka *et al.* 2007), bis diese als konfokal-auflösbare Mikrocluster beobachtet werden können. Diese Mikrocluster sind als Ergebnis des in den Nanoclustern initialisierten Aktivierungsprozesses durch verstärkte TCR-Akkumulation zu sehen (Alarcón *et al.* 2011).

Die Mikrocluster werden mit dem retrograden Aktinfluss in Richtung des Zentrums der adhärenz Zelle transportiert (Yokosuka *et al.* 2005; Campi *et al.* 2005). In den Mikroclustern führen veränderte Interaktionen der TCR-Bestandteile mit den Lipiden zu einer Abwandlung des Lipidumfeldes (Janes

et al. 1999), wodurch Internalisierung erleichtert wird (Kirkham & Parton 2005).

Bei Bindung schwacher Antigene an den TCR sind die mechanischen Kräfte gering bzw. es finden wenige Binde-Löse-Zyklen statt. Dadurch kommt es erst dann zu einem ausreichenden Internalisierungssignal, wenn durch Fusion mit anderen TCR-Mikroclustern genügend mechanische Kräfte auf die Rezeptoren einwirken oder genügend signalverstärkende Proteine wie z. B. Kinasen räumlich konzentriert sind. Im Verlauf dessen bildet sich ein cSMAC aus, in dem der aktivierte TCR internalisiert wird. Ist die Antigenbindung sehr schwach, so sind phosphorylierte TCRs im Inneren des cSMACs detektierbar, da die Internalisierung nur langsam abläuft. Bei etwas stärkerem Antigen überwiegt die Internalisierung, sodass phosphorylierte CD3 ζ -Moleküle nicht detektierbar sind (Cemerski *et al.* 2008).

Die Phosphorylierung und die daraus resultierende Internalisierung erfolgen hingegen schon in den Mikroclustern, wenn zum einen das Antigen stark ist, das heißt häufig und intensiv bindet, oder zum anderen die Mobilität des antigen-präsentierenden Untergrunds verringert ist (Hsu *et al.* 2012) und dadurch die auf den TCR einwirkenden mechanischen Kräfte erhöht sind. Als Resultat sind multifokale Immunologische Synapsen sichtbar und der TCR ist in phosphorylierter Form in Vesikeln lokalisierbar (Yudushkin & Vale 2010).

Je nachdem wie stark die einwirkenden Kräfte auf den Mechanosensor TCR sind, werden multifokale oder klassische Immunologische Synapsen ausgebildet (Tseng *et al.* 2005), die somit nur ein sehr spezielles Endresultat der T-Zell-Aktivierung darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Aivazian, D. & Stern, L. (2000): Phosphorylation of T cell receptor zeta is regulated by a lipid dependent folding transition, *Nat Struct Biol* **7**, 1023-1026.
- Alarcón, B.; Mestre, D. & Martínez-Martín, N. (2011): The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering?, *Immunology*.
- Alberts, B. (2008): *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York, Garland Science.
- Andreyev, A.; Shen, Z.; Guan, Z.; Ryan, A.; Fahy, E.; Subramaniam, S.; Raetz, C.; Briggs, S. & Dennis, E. (2010): Application of Proteomic Marker Ensembles to Subcellular Organelle Identification, *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 388–402.
- Axelrod, D.; Koppel, D.; Schlessinger, J.; Elson, E. & Webb, W. (1976): Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics, *Biophys. J.* **16**, 1055–1069.
- Bachmann, M.; McKall-Faienza, K.; Schmits, R.; Bouchard, D.; Beach, J.; Speiser, D.; Mak, T. & Ohashi, P. (1997): Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation, *Immunity* **7**, 549–557.
- Badour, K.; Zhang, J. & Siminovitch, K. (2004): Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation, *Semin Immunol* **16**, 395–407.
- Balagopalan, L.; Barr, V. & Samelson, L. (2009): Endocytic events in TCR signaling: focus on adapters in microclusters, *Immunol Rev* **232**, 84-98.
- Balagopalan, L.; Barr, V.; Sommers, C.; Barda-Saad, M.; Goyal, A.; Isakowitz, M. & Samelson, L. (2007): c-Cbl-mediated regulation of LAT-nucleated signaling complexes, *Mol Cell Biol* **27**, 8622–8636.
- Baniyash, M.; Garcia-Morales, P.; Luong, E.; Samelson, L. & Klausner, R. (1988): The T cell antigen receptor zeta chain is tyrosine phosphorylated upon activation, *J. Biol. Chem.* **263**, 18225–18230.
- Batista, F.; Iber, D. & Neuberger, M. (2001): B cells acquire antigen from target cells after synapse formation, *Nature* **411**, 489–494.
- Baumgart, T.; Hunt, G.; Farkas, E.; Webb, W. & Feigenson, G. (2007): Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2182–2194.
- Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. & Gatto, G. (2013): *Biochemie*. 7th ed. Heidelberg, Springer Spektrum.

- Blanco, R. & Alarcón, B. (2012): TCR Nanoclusters as the Framework for Transmission of Conformational Changes and Cooperativity, *Front Immunol* **3**, 115.
- Blumberg, R.; Alarcon, B.; Sancho, J.; McDermott, F.; Lopez, P.; Breitmeyer, J. & Terhorst, C. (1990): Assembly and function of the T cell antigen receptor. Requirement of either the lysine or arginine residues in the transmembrane region of the alpha chain, *J Biol Chem* **265**, 14036–14043.
- Bolliger, L. & Johansson, B. (1999): Identification and functional characterization of the zeta-chain dimerization motif for TCR surface expression, *J Immunol* **163**, 3867–3876.
- Bolliger, L.; Johansson, B. & Palmer, E. (1997): The short extracellular domain of the T cell receptor zeta chain is involved in assembly and signal transduction, *Mol Immunol* **34**, 819–827.
- Boniface, J.; Rabinowitz, J.; Wülfing, C.; Hampl, J.; Reich, Z.; Altman, J.; Kantor, R.; Beeson, C.; McConnell, H. & Davis, M. (1998): Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected], *Immunity* **9**, 459–466.
- Borst, J.; Prendiville, M. & Terhorst, C. (1983): The T3 complex on human thymus-derived lymphocytes contains two different subunits of 20 kDa, *Eur J Immunol* **13**, 576–580.
- Brian, A. & McConnell, H. (1984): Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 6159–6163.
- Bromley, S.; Burack, W.; Johnson, K.; Somersalo, K.; Sims, T.; Sumen, C.; Davis, M.; Shaw, A.; Allen, P. & Dustin, M. (2001): The immunological synapse, *Annu Rev Immunol* **19**, 375–396.
- Brossard, C.; Feuillet, V.; Schmitt, A.; Randriamampita, C.; Romao, M.; Raposo, G. & Trautmann, A. (2005): Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse, *Eur. J. Immunol.* **35**, 1741–1753.
- Brown, D. (2002): Isolation and use of rafts, *Curr Protoc Immunol* **11**, Unit 11.10.
- Bunnell, S.; Hong, D.; Kardon, J.; Yamazaki, T.; McGlade, C.; Barr, V. & Samelson, L. (2002): T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies, *J Cell Biol* **158**, 1263–1275.
- Bunnell, S.; Kapoor, V.; Tribble, R.; Zhang, W. & Samelson, L. (2001): Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT, *Immunity* **14**, 315–329.
- Call, M.; Pyrdol, J.; Wiedmann, M. & Wucherpfennig, K. (2002): The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex, *Cell* **111**, 967–979.

- Campi, G.; Varma, R. & Dustin, M. (2005): Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling, *J. Exp. Med.* **202**, 1031–1036.
- Cantrell, D. (2002): T-cell antigen receptor signal transduction, *Immunology* **105**, 369–374.
- Carrasco, Y.; Fleire, S.; Cameron, T.; Dustin, M. & Batista, F. (2004): LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation, *Immunity* **20**, 589–599.
- Carruthers, A. & Melchior, D. (1988): Effects of lipid environment on membrane transport: the human erythrocyte sugar transport protein/lipid bilayer system, *Annu Rev Physiol* **50**, 257–271.
- Carton, I.; Malinina, L. & Richter, R. (2010): Dynamic modulation of the glycosphingolipid content in supported lipid bilayers by glycolipid transfer protein, *Biophys. J.* **99**, 2947–2956.
- Cemerski, S.; Das, J.; Giurisato, E.; Markiewicz, M.; Allen, P.; Chakraborty, A. & Shaw, A. (2008): The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality, *Immunity* **29**, 414–422.
- Contreras, F.-X.; Ernst, A.; Haberkant, P.; Björkholm, P.; Lindahl, E.; Gönen, B.; Tischer, C.; Elofsson, A.; Heijne, G. von & Thiele, C.; Pepperkok, R.; Wieland, F.; Brügger, B. (2012): Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain, *Nature* **481**, 525–529.
- Cooke, I. & Deserno, M. (2006): Coupling between Lipid Shape and Membrane Curvature, *Biophysical Journal* **91**, 487–495.
- Cosson, P.; Lankford, S.; Bonifacio, J. & Klausner, R. (1991): Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs, *Nature* **351**, 414–416.
- Czech, M. (2000): PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface, *Cell* **100**, 603–606.
- Danielli, J. & Davson, H. (1935): A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.* **5**, 495–508.
- Davis, M.; Boniface, J.; Reich, Z.; Lyons, D.; Hampl, J.; Arden, B. & Chien, Y. (1998): Ligand recognition by alpha beta T cell receptors, *Annu Rev Immunol* **16**, 523–544.
- Davis, S. & van der Merwe, P. (2006): The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond, *Nat Immunol* **7**, 803–809.
- Deford-Watts, L.; Dougall, D.; Belkaya, S.; Johnson, B.; Eitson, J.; Roybal, K.; Barylko, B.; Albanesi, J.; Wülfing, C. & van Oers, N. (2011): The CD3 zeta Subunit Contains a Phosphoinositide-Binding Motif That Is Required for the

Stable Accumulation of TCR-CD3 Complex at the Immunological Synapse, *J Immunol*.

D'Oro, U.; Munitic, I.; Chacko, G.; Karpova, T.; McNally, J. & Ashwell, J. (2002): Regulation of constitutive TCR internalization by the zeta-chain, *J Immunol* **169**, 6269–6278.

Dowhan, W. & Bogdanov, M. (2011): Lipid-protein interactions as determinants of membrane protein structure and function, *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 767–774.

Dustin, M. (2009): The cellular context of T cell signaling, *Immunity* **30**, 482–492.

Dustin, M.; Chakraborty, A. & Shaw, A. (2010): Understanding the Structure and Function of the Immunological Synapse, *Cold Spring Harb Perspect Biol*.

Dustin, M. & Groves, J. (2012): Receptor signaling clusters in the immune synapse, *Annu Rev Biophys* **41**, 543–556.

Dustin, M.; Olszowy, M.; Holdorf, A.; Li, J.; Bromley, S.; Desai, N.; Widder, P.; Rosenberger, F.; van der Merwe, P. & Allen, P.; Shaw, A. (1998): A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts, *Cell* **94**, 667–677.

Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V.; Hein, B.; Middendorff, C. von & Schönle, A.; Hell, S. (2009): Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell, *Nature* **457**, 1159–1162.

Essen, M. von; Bonefeld, C.; Siersma, V.; Rasmussen, A.; Lauritsen, J.; Nielsen, B. & Geisler, C. (2004): Constitutive and ligand-induced TCR degradation, *J Immunol* **173**, 384–393.

Faroudi, M.; Utzny, C.; Salio, M.; Cerundolo, V.; Guiraud, M.; Muller, S. & Valitutti, S. (2003): Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold, *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14145–14150.

Fernández-Miguel, G.; Alarcón, B.; Iglesias, A.; Bluethmann, H.; Alvarez-Mon, M.; Sanz, E. & La Hera, A. de (1999): Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 1547–1552.

Ficz, G. (2005): *Protein dynamics in the nucleus: Implications for gene expression*.

Fischer, K.; Kong, Y.; Nishina, H.; Tedford, K.; Marengere, L.; Kozieradzki, I.; Sasaki, T.; Starr, M.; Chan, G. & Gardener, S.; Nghiem, M.; Bouchard, D.; Barbacid, M.; Bernstein, A.; Penninger, J. (1998): Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor, *Curr Biol* **8**, 554–562.

- Floyd, D.; Ragains, J.; Skehel, J.; Harrison, S. & van Oijen, A. (2008): Single-particle kinetics of influenza virus membrane fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15382–15387.
- Folmer, R.; Geschwindner, S. & Xue, Y. (2002): Crystal structure and NMR studies of the apo SH2 domains of ZAP-70: two bikes rather than a tandem, *Biochemistry* **41**, 14176–14184.
- Frye, L. & Edidin, M. (1970): The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons, *J. Cell. Sci.* **7**, 319–335.
- Fujiwara, T.; Ritchie, K.; Murakoshi, H.; Jacobson, K. & Kusumi, A. (2002): Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane, *J Cell Biol* **157**, 1071–1081.
- Gagnon, E.; Schubert, D.; Gordo, S.; Chu, H. & Wucherpfennig, K. (2012): Local changes in lipid environment of TCR microclusters regulate membrane binding by the CD3epsilon cytoplasmic domain, *J Exp Med* **209**, 2423–2439.
- Geiger, B.; Rosen, D. & Berke, G. (1982): Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells, *J Cell Biol* **95**, 137–143.
- Gil, D.; Schrum, A.; Alarcon, B. & Palmer, E. (2005): T cell receptor engagement by peptide-MHC ligands induces a conformational change in the CD3 complex of thymocytes, *J Exp Med* **201**, 517–522.
- Goh, S.; Amazon, J. & Feigenson, G. (2013): Toward a better raft model: modulated phases in the four-component bilayer, DSPC/DOPC/POPC/CHOL, *Biophys J* **104**, 853–862.
- Gorter, E. & Grendel, F. (1925): ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD, *J. Exp. Med.* **41**, 439–443.
- Grakoui, A.; Bromley, S.; Sumen, C.; Davis, M.; Shaw, A.; Allen, P. & Dustin, M. (1999): The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation, *Science* **285**, 221–227.
- Groves, J.; Ulman, N. & Boxer, S. (1997): Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports, *Science* **275**, 651–653.
- Hafeman, D.; Tschanner, V. von & McConnell, H. (1981): Specific antibody-dependent interactions between macrophages and lipid haptens in planar lipid monolayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4552–4556.
- Halemani, N.; Bethani, I.; Rizzoli, S. & Lang, T. (2010): Structure and Dynamics of a Two-Helix SNARE Complex in Live Cells, *Traffic* **11**, 394–404.
- Halter, D.; Neumann, S.; van Dijk, S.; Wolthoorn, J.; Maziere, A. de; Vieira, O.; Mattjus, P.; Klumperman, J.; van Meer, G. & Sprong, H. (2007): Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis, *J Cell Biol* **179**, 101–115.

- Hanada, K.; Kumagai, K.; Yasuda, S.; Miura, Y.; Kawano, M.; Fukasawa, M. & Nishijima, M. (2003): Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide, *Nature* **426**, 803–809.
- Harder, T. & Simons, K. (1999): Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation, *Eur. J. Immunol.* **29**, 556–562.
- Hashimoto-Tane, A.; Yokosuka, T.; Sakata-Sogawa, K.; Sakuma, M.; Ishihara, C.; Tokunaga, M. & Saito, T. (2011): Dynein-driven transport of T cell receptor microclusters regulates immune synapse formation and T cell activation, *Immunity* **34**, 919–931.
- Heinemann, C.; Chow, R.; Neher, E. & Zucker, R. (1994): Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca^{2+} , *Biophys. J.* **67**, 2546–2557.
- Helmkamp, G. JR (1986): Phospholipid transfer proteins: mechanism of action, *J Bioenerg Biomembr* **18**, 71–91.
- Heumann, R.; Kachel, V. & Thoenen, H. (1983): Relationship between NGF-mediated volume increase and "priming effect" in fast and slow reacting clones of PC12 pheochromocytoma cells. Role of cAMP, *Exp. Cell Res.* **145**, 179–190.
- Hogan, P.; Lewis, R. & Rao, A. (2010): Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI, *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 491–533.
- Holthuis, J.; van Meer, G. & Huitema, K. (2003): Lipid microdomains, lipid translocation and the organization of intracellular membrane transport (Review), *Mol Membr Biol* **20**, 231–241.
- Horejsí, V. (2005): Lipid rafts and their roles in T-cell activation, *Microbes Infect.* **7**, 310–316.
- Hsu, C.-J.; Hsieh, W.-T.; Waldman, A.; Clarke, F.; Huseby, E.; Burkhardt, J. & Baumgart, T. (2012): Ligand mobility modulates immunological synapse formation and T cell activation, *PLoS ONE* **7**, e32398.
- Huang, J.; Zarnitsyna, V.; Liu, B.; Edwards, L.; Jiang, N.; Evavold, B. & Zhu, C. (2010): The kinetics of two-dimensional TCR and pMHC interactions determine T-cell responsiveness, *Nature* **464**, 932–936.
- Hull, M.; Cambrea, L. & Hovis, J. (2005): Infrared spectroscopy of fluid lipid bilayers, *Anal. Chem.* **77**, 6096–6099.
- Huppa, J.; Axmann, M.; Mörtelmaier, M.; Lillemeier, B.; Newell, E.; Brameshuber, M.; Klein, L.; Schütz, G. & Davis, M. (2010): TCR–peptide–MHC interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity, *Nature* **463**, 963–967.

- Huse, M.; Klein, L.; Girvin, A.; Faraj, J.; Li, Q.-j.; Kuhns, M. & Davis, M. (2007): Spatial and temporal dynamics of T cell receptor signaling with a photoactivatable agonist, *Immunity* **27**, 76–88.
- Ilani, T.; Vasiliver-Shamis, G.; Vardhana, S.; Bretscher, A. & Dustin, M. (2009): T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA, *Nat Immunol* **10**, 531–539.
- Illinger, D.; Kubina, M.; Duportail, G.; Poindron, P.; Bartholeyns, J. & Kuhry, J. (1989): TMA-DPH a fluorescent probe of membrane dynamics in living cells. How to use it in phagocytosis, *Cell Biophys.* **14**, 17–26.
- Ipsen, J.; Karlström, G.; Mouritsen, O.; Wennerström, H. & Zuckermann, M. (1987): Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system, *Biochim. Biophys. Acta* **905**, 162–172.
- Irvine, D.; Purbhoo, M.; Krogsgaard, M. & Davis, M. (2002): Direct observation of ligand recognition by T cells, *Nature* **419**, 845–849.
- Irving, B.; Chan, A. & Weiss, A. (1993): Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain, *J Exp Med* **177**, 1093–1103.
- Irving, B. & Weiss, A. (1991): The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways, *Cell* **64**, 891–901.
- Isenberg, W.; McEver, R.; Phillips, D.; Shuman, M. & Bainton, D. (1987): The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering, *J. Cell Biol.* **104**, 1655–1663.
- Iwao, M.; Morisaki, H.; Matsunaga, H. & Morisaki, T. (2001): Two novel polymorphisms g.1715G>A (A496T) and g.1838G>A (3'UTR), and the g.1548G>A (E469K) variant in the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) gene: Distribution in the Japanese and European American populations, *Hum. Mutat.* **17**, 355.
- Iwao, M.; Morisaki, H. & Morisaki, T. (2004): Single-nucleotide polymorphism g.1548G A (E469K) in human ICAM-1 gene affects mRNA splicing pattern and TPA-induced apoptosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 729–735.
- James, J.; McColl, J.; Oliveira, M.; Dunne, P.; Huang, E.; Jansson, A.; Nilsson, P.; Sleep, D.; Gonçalves, C. & Morgan, S.; Felce, J.; Mahen, R.; Fernandes, R.; Carmo, A.; Klenerman, D.; Davis, S. (2011): The T cell receptor triggering apparatus is composed of monovalent or monomeric proteins, *J Biol Chem* **286**, 31993–32001.
- Janes, P.; Ley, S. & Magee, A. (1999): Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor, *J. Cell Biol.* **147**, 447–461.

- Janeway, C. (2008): *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York, Garland Science.
- Johansson, B.; Palmer, E. & Bolliger, L. (1999): The extracellular domain of the zeta-chain is essential for TCR function, *J. Immunol.* **162**, 878–885.
- June, C.; Fletcher, M.; Ledbetter, J.; Schieven, G.; Siegel, J.; Phillips, A. & Samelson, L. (1990): Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction, *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7722–7726.
- Kabayama, K.; Sato, T.; Saito, K.; Loberto, N.; Prinetti, A.; Sonnino, S.; Kinjo, M.; Igarashi, Y. & Inokuchi, J.-i. (2007): Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 13678–13683.
- Kai, M.; Sakane, F.; Jia, Y.-J.; Imai, S.-I.; Yasuda, S. & Kanoh, H. (2006): Lipid phosphate phosphatases 1 and 3 are localized in distinct lipid rafts, *J. Biochem.* **140**, 677–686.
- Kaizuka, Y.; Douglass, A.; Varma, R.; Dustin, M. & Vale, R. (2007): Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20296–20301.
- Kane, L.; Lin, J. & Weiss, A. (2000): Signal transduction by the TCR for antigen, *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 242–249.
- Kanellopoulos, J.; Wigglesworth, N.; Owen, M. & Crumpton, M. (1983): Biosynthesis and molecular nature of the T3 antigen of human T lymphocytes, *EMBO J.* **2**, 1807–1814.
- Kang, H.; Wei, J. & Cohen, D. (2010): PC-TP/StARD2: Of membranes and metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 449–456.
- Kim, S.; Shin, Y.; Brazin, K.; Mallis, R.; Sun, Z.-Y.; Wagner, G.; Lang, M. & Reinherz, E. (2012): TCR Mechanobiology: Torques and Tunable Structures Linked to Early T Cell Signaling, *Front Immunol* **3**, 76.
- Kim, S.; Takeuchi, K.; Sun, Z.-Y.; Touma, M.; Castro, C.; Fahmy, A.; Lang, M.; Wagner, G. & Reinherz, E. (2009): The T Cell Receptor Is an Anisotropic Mechanosensor, *Journal of Biological Chemistry* **284**, 31028–31037.
- Kinsky, S. & Nicolotti, R. (1977): Immunological properties of model membranes, *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 49–67.
- Kirkham, M. & Parton, R. (2005): Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers, *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 349–363.
- Klammt, C. (2012): How membrane structures control T cell signaling, *Front. Immun.*

- Kneen, M.; Farinas, J.; Li, Y. & Verkman, A. (1998): Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator, *Biophys. J.* **74**, 1591–1599.
- Kohfeldt, E.; Maurer, P.; Vannahme, C. & Timpl, R. (1997): Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican, *FEBS Lett.* **414**, 557–561.
- Krummel, M.; Sjaastad, M.; Wülfing, C. & Davis, M. (2000): Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition, *Science* **289**, 1349–1352.
- Kuhns, M. & Davis, M. (2007): Disruption of extracellular interactions impairs T cell receptor-CD3 complex stability and signaling, *Immunity* **26**, 357–369.
- Kuhns, M. & Davis, M. (2008): The safety on the TCR trigger, *Cell* **135**, 594–596.
- Kumar, R.; Ferez, M.; Swamy, M.; Arechaga, I.; Rejas, M.; Valpuesta, J.; Schamel, W.; Alarcon, B. & van Santen, H. (2011): Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment of oligomeric T cell receptor complexes, *Immunity* **35**, 375–387.
- Kupfer, A. (1987): The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells, *Journal of Experimental Medicine* **165**, 1565–1580.
- Kusumi, A.; Nakada, C.; Ritchie, K.; Murase, K.; Suzuki, K.; Murakoshi, H.; Kasai, R.; Kondo, J. & Fujiwara, T. (2005): Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 351–378.
- Kyhse-Andersen, J. (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203–209.
- Laemmli, U. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685.
- Lang, T. (2003): Imaging SNAREs at work in 'unroofed' cells--approaches that may be of general interest for functional studies on membrane proteins, *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 861–864.
- Lang, T. (2007): SNARE proteins and 'membrane rafts', *J Physiol* **585**, 693–698.
- Lauria, I.; van Üüm, J.; Mjumjunov-Crnecic, E.; Walrafen, D.; Spitta, L.; Thiele, C. & Lang, T. (2013): GLTP Mediated Non-Vesicular GM1 Transport between Native Membranes, *PLoS ONE* **8**, e59871.
- Lee, K.-H. (2002): T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation, *Science* **295**, 1539–1542.

- Lee, K.-H. (2003): The Immunological Synapse Balances T Cell Receptor Signaling and Degradation, *Science* **302**, 1218–1222.
- Lenard, J. & Singer, S. (1966): Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **56**, 1828–1835.
- Lev, S. (2010): Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond, *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 739–750.
- Lillemeier, B.; Mörtelmaier, M.; Forstner, M.; Huppa, J.; Groves, J. & Davis, M. (2010): TCR and Lat are expressed on separate protein islands on T cell membranes and concatenate during activation, *Nat Immunol* **11**, 90–96.
- Lillemeier, B.; Pfeiffer, J.; Surviladze, Z.; Wilson & Davis, M. (2006): Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton, *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18992–18997.
- Li, Y.; Chen, B.; Wu, P.; Cheng, T.; Kao, L.; Tao, M.; Lieber, A. & Roffler, S. (2010): Cutting Edge: Mechanical Forces Acting on T Cells Immobilized via the TCR Complex Can Trigger TCR Signaling, *The Journal of Immunology* **184**, 5959–5963.
- Love, P. & Hayes, S. (2010): ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a002485.
- Low, S.; Vasanji, A.; Nanduri, J.; He, M.; Sharma, N.; Koo, M.; Drazba, J. & Weimbs, T. (2006): Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity, *Mol. Biol. Cell* **17**, 977–989.
- Mairhofer, M.; Steiner, M.; Mosgoeller, W.; Prohaska, R. & Salzer, U. (2002): Stomatin is a major lipid-raft component of platelet alpha granules, *Blood* **100**, 897–904.
- Malakhova, M.; Malinina, L.; Pike, H.; Kanack, A.; Patel, D. & Brown, R. (2005): Point mutational analysis of the liganding site in human glycolipid transfer protein. Functionality of the complex, *J Biol Chem* **280**, 26312–26320.
- Malinina, L.; Malakhova, M.; Teplov, A.; Brown, R. & Patel, D. (2004): Structural basis for glycosphingolipid transfer specificity, *Nature* **430**, 1048–1053.
- Manders, E.; Stap, J.; Brakenhoff, G.; van Driel, R. & Aten, J. (1992): Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy, *J. Cell. Sci.* **103 (Pt 3)**, 857–862.
- Manolios, N.; Bonifacino, J. & Klausner, R. (1990): Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex, *Science* **249**, 274–277.

- Mansy, S. (2010): Membrane Transport in Primitive Cells, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, a002188.
- Manz, B.; Jackson, B.; Petit, R.; Dustin, M. & Groves, J. (2011): T-cell triggering thresholds are modulated by the number of antigen within individual T-cell receptor clusters, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 9089–9094.
- Marrack, P. & Kappler, J. (1986): The T cell and its receptor, *Sci Am* **254**, 36–45.
- Martínez-Martín, N.; Fernández-Arenas, E.; Cemerski, S.; Delgado, P.; Turner, M.; Heuser, J.; Irvine, D.; Huang, B.; Bustelo, X. & Shaw, A.; Alarcón, B. (2011): T Cell Receptor Internalization from the Immunological Synapse Is Mediated by TC21 and RhoG GTPase-Dependent Phagocytosis, *Immunity* **35**, 208-222.
- Martinez-Martin, N.; Risueno, R.; Morreale, A.; Zaldivar, I.; Fernandez-Arenas, E.; Herranz, F.; Ortiz, A. & Alarcon, B. (2009): Cooperativity Between T Cell Receptor Complexes Revealed by Conformational Mutants of CD3, *Science Signaling* **2**, ra43.
- Maxfield, F. & van Meer, G. (2010): Cholesterol, the central lipid of mammalian cells, *Curr Opin Cell Biol* **22**, 422–429.
- Ma, Z. & Finkel, T. (2010): T cell receptor triggering by force, *Trends Immunol* **31**, 1–6.
- McConnell, H.; Watts, T.; Weis, R. & Brian, A. (1986): Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition in the immune system, *Biochim Biophys Acta* **864**, 95-106.
- McKeithan, T. (1995): Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5042–5046.
- Metz, R. & Radin, N. (1980): Glucosylceramide uptake protein from spleen cytosol, *J. Biol. Chem.* **255**, 4463–4467.
- Milligan, S.; Alb, J.; Elagina, R.; Bankaitis, V. & Hyde, D. (1997): The Phosphatidylinositol Transfer Protein Domain of Drosophila Retinal Degeneration B Protein Is Essential for Photoreceptor Cell Survival and Recovery from Light Stimulation, *The Journal of Cell Biology* **139**, 351–363.
- Minguet, S.; Swamy, M.; Dopfer, E.; Dengler, E.; Alarcón, B. & Wolfgang W A Schamel (2008a): The extracellular part of zeta is buried in the T cell antigen receptor complex, *Immunol Lett* **116**, 203-210.
- Minguet, S.; Swamy, M. & Schamel, W. (2008b): The short length of the extracellular domain of zeta is crucial for T cell antigen receptor function, *Immunol Lett* **116**, 195-202.
- Monks, C.; Freiberg, B.; Kupfer, H.; Sciaky, N. & Kupfer, A. (1998): Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells, *Nature* **395**, 82-86.

- Mossman, K.; Campi, G.; Groves, J. & Dustin, M. (2005): Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses, *Science* **310**, 1191–1193.
- Mukhopadhyay, H.; Cordoba, S.-P.; Maini, P.; van der Merwe, P. & Dushek, O. (2013): Systems model of T cell receptor proximal signaling reveals emergent ultrasensitivity, *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003004.
- Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. 6th ed. Heidelberg, Spektrum Akad.-Verlag.
- Munro, S. (2003): Lipid rafts: elusive or illusive?, *Cell* **115**, 377–388.
- Nakamura, K.; Watakabe, A.; Hioki, H.; Fujiyama, F.; Tanaka, Y.; Yamamori, T. & Kaneko, T. (2007): Transiently increased colocalization of vesicular glutamate transporters 1 and 2 at single axon terminals during postnatal development of mouse neocortex: a quantitative analysis with correlation coefficient, *Eur. J. Neurosci.* **26**, 3054–3067.
- Nguyen, K.; Sylvain, N. & Bunnell, S. (2008): T cell costimulation via the integrin VLA-4 inhibits the actin-dependent centralization of signaling microclusters containing the adaptor SLP-76, *Immunity* **28**, 810–821.
- Nye, J. & Groves, J. (2008): Kinetic control of histidine-tagged protein surface density on supported lipid bilayers, *Langmuir* **24**, 4145–4149.
- Nylund, M. & Mattjus, P. (2005): Protein mediated glycolipid transfer is inhibited FROM sphingomyelin membranes but enhanced TO sphingomyelin containing raft like membranes, *Biochim Biophys Acta* **1669**, 87–94.
- Ohvo-Rekilä, H. & Mattjus, P. (2011): Monitoring glycolipid transfer protein activity and membrane interaction with the surface plasmon resonance technique, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1808**, 47–54.
- Oude Weernink, P.; Lopez de Jesus, M. & Schmidt, M. (2007): Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **374**, 399–411.
- Overton, E. (1895): *Ueber die osmotischen Eigenschaften der lebenden Pflanzen- und Tierzelle*, Zürich, Fäsi & Beer.
- Patel, R.; Kumar, U.; Lamb, D.; Eid, J.; Rocheville, M.; Grant, M.; Rani, A.; Hazlett, T.; Patel, S. & Gratton, E.; Patel, Y. (2002): Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 3294–3299.
- Pautot, S.; Lee, H.; Isacoff, E. & Groves, J. (2005): Neuronal synapse interaction reconstituted between live cells and supported lipid bilayers, *Nat Chem Biol* **1**, 283–289.
- Pike, L. (2006): Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function, *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598.

- Purtic, B.; Pitcher, L.; van Oers, N. & Wulfig, C. (2005): T cell receptor (TCR) clustering in the immunological synapse integrates TCR and costimulatory signaling in selected T cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2904–2909.
- Quintana, A.; Pasche, M.; Junker, C.; Al-Ansary, D.; Rieger, H.; Kummerow, C.; Nuñez, L.; Villalobos, C.; Meraner, P. & Becherer, U.; Rettig, J.; Niemeyer, B.; Hoth, M. (2011): Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation, *EMBO J.* **30**, 3895–3912.
- Quintana, A.; Schwindling, C.; Wenning, A.; Becherer, U.; Rettig, J.; Schwarz, E. & Hoth, M. (2007): T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse, *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14418–14423.
- Rabinowitz, J.; Beeson, C.; Lyons, D.; Davis, M. & McConnell, H. (1996): Kinetic discrimination in T-cell activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1401–1405.
- Rao, C.; Lin, X.; Pike, H.; Molotkovsky, J. & Brown, R. (2004): Glycolipid transfer protein mediated transfer of glycosphingolipids between membranes: a model for action based on kinetic and thermodynamic analyses, *Biochemistry* **43**, 13805–13815.
- Rehm, H. & Letzel, T. (2010): *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. 6th ed. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.
- Reth, M. (1989): Antigen receptor tail clue, *Nature* **338**, 383–384.
- Rickman, C.; Medine, C.; Dun, A.; Moulton, D.; Mandula, O.; Halemani, N.; Rizzoli, S.; Chamberlain, L. & Duncan, R. (2010): t-SNARE protein conformations patterned by the lipid microenvironment, *J Biol Chem* **285**, 13535–13541.
- Risueño, R.; Schamel, W.; Alarcón, B. & Kanellopoulos, J. (2008): T Cell Receptor Engagement Triggers Its CD3 ϵ and CD3 ζ Subunits to Adopt a Compact, Locked Conformation, *PLoS One* **3**, e1747.
- Romeo, C.; Amiot, M. & Seed, B. (1992): Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain, *Cell* **68**, 889–897.
- Roux, A.; Cuvelier, D.; Nassoy, P.; Prost, J.; Bassereau, P. & Goud, B. (2005): Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules, *EMBO J.* **24**, 1537–1545.
- Rutledge, T.; Cosson, P.; Manolios, N.; Bonifacino, J. & Klausner, R. (1992): Transmembrane helical interactions: zeta chain dimerization and functional association with the T cell antigen receptor, *EMBO J* **11**, 3245–3254.

- Sako, Y. & Kusumi, A. (1995): Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether, *J. Cell Biol.* **129**, 1559–1574.
- Salaun, C.; Gould, G. & Chamberlain, L. (2005): The SNARE proteins SNAP-25 and SNAP-23 display different affinities for lipid rafts in PC12 cells. Regulation by distinct cysteine-rich domains, *J Biol Chem* **280**, 1236–1240.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. & Maniatis, T. (2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2006): *The condensed protocols from Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samelson, L.; Harford, J. & Klausner, R. (1985): Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex, *Cell* **43**, 223–231.
- Samelson, L.; Patel, M.; Weissman, A.; Harford, J. & Klausner, R. (1986): Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor, *Cell* **46**, 1083–1090.
- Sasaki, T. (1990): Glycolipid transfer protein and intracellular traffic of glucosylceramide, *Experientia* **46**, 611–616.
- Schamel, W. (2005): Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity and wide range of response, *Journal of Experimental Medicine* **202**, 493–503.
- Schamel, W. & Alarcón, B. (2013): Organization of the resting TCR in nanoscale oligomers, *Immunol Rev* **251**, 13–20.
- Schamel, W.; Risueno, R.; Minguet, S.; Ortiz, A. & Alarcon, B. (2006): A conformation- and avidity-based proofreading mechanism for the TCR-CD3 complex, *Trends Immunol* **27**, 176–182.
- Scherfeld, D.; Kahya, N. & Schwille, P. (2003): Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol, *Biophys J* **85**, 3758–3768.
- Schlegel, R. & Williamson, P. (2001): Phosphatidylserine, a death knell, *Cell Death Differ* **8**, 551–563.
- Schmitz, S. (2009): *Der Experimentator: Zellkultur*. 2nd ed. Heidelberg, Spektrum, Akad. Verl.
- Schneider, C.; Rasband, W. & Eliceiri, K. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat Meth* **9**, 671–675.
- Schneider, U.; Schwenk, H. & Bornkamm, G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with

acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int. J. Cancer* **19**, 621–626.

Schreiber, A.; Fischer, S. & Lang, T. (2012): The amyloid precursor protein forms plasmalemmal clusters via its pathogenic amyloid-beta domain, *Biophys J* **102**, 1411–1417.

Schrum, A.; Gil, D.; Turka, L. & Palmer, E. (2011): Physical and functional bivalency observed among TCR/CD3 complexes isolated from primary T cells, *J Immunol* **187**, 870–878.

Schulte, A.; Lorenzen, I.; Bottcher, M. & Plieth, C. (2006): A novel fluorescent pH probe for expression in plants, *Plant Methods* **2**, 7.

Schulze, H.; Kolter, T. & Sandhoff, K. (2009): Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation, *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 674–683.

Schwartzberg, P.; Finkelstein, L. & Readinger, J. (2005): TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation, *Nat Rev Immunol* **5**, 284–295.

Schwarzmann, G. (2001): Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells, *Semin Cell Dev Biol* **12**, 163–171.

Schwarzmann, G.; Hofmann, P.; Pütz, U. & Albrecht, B. (1995): Demonstration of direct glycosylation of nondegradable glucosylceramide analogs in cultured cells, *J. Biol. Chem.* **270**, 21271–21276.

Seu, K.; Pandey, A.; Haque, F.; Proctor, E.; Ribbe, A. & Hovis, J. (2007): Effect of surface treatment on diffusion and domain formation in supported lipid bilayers, *Biophys. J.* **92**, 2445–2450.

Sezgin, E.; Levental, I.; Grzybek, M.; Schwarzmann, G.; Mueller, V.; Honigsmann, A.; Belov, V.; Eggeling, C.; Coskun, U. & Simons, K.; Schwille, P. (2012): Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes, *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1777–1784.

Sheetz, M.; Schindler, M. & Koppel, D. (1980): Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes, *Nature* **285**, 510–511.

Shen, K.; Tsai, J.; Shi, P. & Kam, L. (2009): Self-aligned supported lipid bilayers for patterning the cell-substrate interface, *J Am Chem Soc* **131**, 13204–13205.

Sherman, E.; Barr, V.; Manley, S.; Patterson, G.; Balagopalan, L.; Akpan, I.; Regan, C.; Merrill, R.; Sommers, C. & Lippincott-Schwartz, J.; Samelson, L. (2011): Functional nanoscale organization of signaling molecules downstream of the T cell antigen receptor, *Immunity* **35**, 705–720.

Shi, X.; Bi, Y.; Yang, W.; Guo, X.; Jiang, Y.; Wan, C.; Li, L.; Bai, Y.; Guo, J. & Wang, Y.; Chen, X.; Wu, B.; Sun, H.; Liu, W.; Wang, J.; Xu, C. (2013): Ca²⁺

regulates T-cell receptor activation by modulating the charge property of lipids, *Nature* **493**, 111–115.

Sieber, J.; Willig, K.; Heintzmann, R.; Hell, S. & Lang, T. (2006): The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane, *Biophys J* **90**, 2843–2851.

Sieber, J.; Willig, K.; Kutzner, C.; Gerding-Reimers, C.; Harke, B.; Donnert, G.; Rammner, B.; Eggeling, C.; Hell, S. & Grubmüller, H.; Lang, T. (2007): Anatomy and Dynamics of a Supramolecular Membrane Protein Cluster, *Science* **317**, 1072–1076.

Sigalov, A. (2011): Uncoupled binding and folding of immune signaling-related intrinsically disordered proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **106**, 525–536.

Sigalov, A.; Aivazian, D.; Uversky, V. & Stern, L. (2006): Lipid-binding activity of intrinsically unstructured cytoplasmic domains of multichain immune recognition receptor signaling subunits, *Biochemistry* **45**, 15731–15739.

Simons, K. & Fuller, S. (1985): Cell surface polarity in epithelia, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 243–288.

Simons, K. & Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes, *Nature* **387**, 569–572.

Singer, S. & Nicolson, G. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* **175**, 720–731.

Staunton, D.; Dustin, M.; Erickson, H. & Springer, T. (1990): The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus, *Cell* **61**, 243–254.

Staunton, D.; Marlin, S.; Stratowa, C.; Dustin, M. & Springer, T. (1988): Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families, *Cell* **52**, 925–933.

Stinchcombe, J.; Majorovits, E.; Bossi, G.; Fuller, S. & Griffiths, G. (2006): Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse, *Nature* **443**, 462–465.

Sun, Z.; Kim, K.; Wagner, G. & Reinherz, E. (2001): Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer, *Cell* **105**, 913–923.

Surma, M.; Klose, C. & Simons, K. (2012): Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network, *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1059–1067.

Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E.; Grønborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brugger, B. & Ringler, P.; Müller, S.; Rammner, B.; Gräter, F.; Hub, J.; Groot, B. de; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmüller, H.; Heuser, J.; Wieland, F.; Jahn, R. (2006): Molecular anatomy of a trafficking organelle, *Cell* **127**, 831–846.

- Thiele, C.; Papan, C.; Hoelper, D.; Kusserow, K.; Gaebler, A.; Schoene, M.; Piotrowitz, K.; Lohmann, D.; Spandl, J. & Stevanovic, A.; Shevchenko, A.; Kuerschner, L. (2012): Tracing fatty acid metabolism by click chemistry, *ACS Chem Biol* **7**, 2004–2011.
- Thomas, S.; Kumar, R.; Casares, S. & Brumeanu, T.-D. (2003): Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane, *J Immunol Methods* **275**, 161–168.
- Towbin, H.; Staehelin, T. & Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350–4354.
- Tseng, S.-Y.; Liu, M. & Dustin, M. (2005): CD80 cytoplasmic domain controls localization of CD28, CTLA-4, and protein kinase C θ in the immunological synapse, *J. Immunol.* **175**, 7829–7836.
- Tseng, S.-Y.; Waite, J.; Liu, M.; Vardhana, S. & Dustin, M. (2008): T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C θ , *J Immunol* **181**, 4852–4863.
- Tuuf, J. & Mattjus, P. (2007): Human glycolipid transfer protein--intracellular localization and effects on the sphingolipid synthesis, *Biochim Biophys Acta* **1771**, 1353–1363.
- Uhles, S.; Moede, T.; Leibiger, B.; Berggren, P.-O. & Leibiger, I. (2003): Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains, *J Cell Biol* **163**, 1327–1337.
- Valitutti, S.; Coombs, D. & Dupré, L. (2010): The space and time frames of T cell activation at the immunological synapse, *FEBS Lett.*
- Valitutti, S. & Dupre, L. (2010): Plasticity of immunological synapses, *Curr Top Microbiol Immunol* **340**, 209–228.
- Valitutti, S.; Müller, S.; Cella, M.; Padovan, E. & Lanzavecchia, A. (1995): Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes, *Nature* **375**, 148–151.
- van der Merwe, P. & Dushek, O. (2011): Mechanisms for T cell receptor triggering, *Nat Rev Immunol* **11**, 47–55.
- van Meer, G. (2011): Dynamic Transbilayer Lipid Asymmetry, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a004671.
- van Meer, G. & Simons, K. (1988): Lipid polarity and sorting in epithelial cells, *J. Cell. Biochem.* **36**, 51–58.
- van Meer, G.; Voelker, D. & Feigenson, G. (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 112–124.
- van Seventer, G.; Shimizu, Y.; Horgan, K. & Shaw, S. (1990): The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells, *J Immunol* **144**, 4579–4586.

- Vardhana, S.; Choudhuri, K.; Varma, R. & Dustin, M. (2010): Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster, *Immunity* **32**, 531–540.
- Vardhana, S. & Dustin, M. (2008): Supported Planar Bilayers for the Formation of Study of Immunological Synapses and Kinapse, *J Vis Exp*.
- Varma, R.; Campi, G.; Yokosuka, T.; Saito, T. & Dustin, M. (2006): T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster, *Immunity* **25**, 117-127.
- Venkatakrisnan, A.; Deupi, X.; Lebon, G.; Tate, C.; Schertler, G. & Babu, M. (2013): Molecular signatures of G-protein-coupled receptors, *Nature* **494**, 185–194.
- Verwilghen, J.; Baroja, M.; van Vaeck, F.; van Damme, J. & Ceuppens, J. (1991): Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation, *Immunology* **72**, 269–276.
- Viola, A. & Gupta, N. (2007): Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins, *Nat Rev Immunol* **7**, 889–896.
- Walrafen, D. (2012): *Kontrolle der lateralen Organisation von Membranproteinen*.
- Watts, T.; Gaub, H. & McConnell, H. (1986): T-cell-mediated association of peptide antigen and major histocompatibility complex protein detected by energy transfer in an evanescent wave-field, *Nature* **320**, 179–181.
- Whitmarsh, A. & Davis, R. (1996): Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, *J. Mol. Med.* **74**, 589–607.
- Wiedemann, A.; Muller, S.; Favier, B.; Penna, D.; Guiraud, M.; Delmas, C.; Champagne, E. & Valitutti, S. (2005): T-cell activation is accompanied by an ubiquitination process occurring at the immunological synapse, *Immunol Lett* **98**, 57–61.
- Winterbourn, C. & Batt, R. (1970): Lipid composition of human red cells of different ages, *Biochim. Biophys. Acta* **202**, 1–8.
- Wirtz, K. (1997): Phospholipid transfer proteins revisited, *Biochem J* **324 (Pt 2)**, 353–360.
- Wirtz, K. & Zilversmit, D. (1968): Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes in vitro, *J. Biol. Chem.* **243**, 3596–3602.
- Wülfing, C.; Sjaastad, M. & Davis, M. (1998): Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6302-6307.

- Xavier, R. & Seed, B. (1999): Membrane compartmentation and the response to antigen, *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 265–269.
- Xu, C.; Gagnon, E.; Call, M.; Schnell, J.; Schwieters, C.; Carman, C.; Chou, J. & Wucherpfennig, K. (2008): Regulation of T Cell Receptor Activation by Dynamic Membrane Binding of the CD3 ϵ Cytoplasmic Tyrosine-Based Motif, *Cell* **135**, 702–713.
- Xu, Q.; Lin, W.-C.; Petit, R. & Groves, J. (2011): EphA2 Receptor Activation by Monomeric Ephrin-A1 on Supported Membranes, *Biophysical Journal* **101**, 2731–2739.
- Yamada, K.; Abe, A. & Sasaki, T. (1985): Specificity of the glycolipid transfer protein from pig brain, *J Biol Chem* **260**, 4615–4621.
- Yamada, K.; Abe, A. & Sasaki, T. (1986): Glycolipid transfer protein from pig brain transfers glycolipids with beta-linked sugars but not with alpha-linked sugars at the sugar-lipid linkage, *Biochim Biophys Acta* **879**, 345–349.
- Yang, Y.; Jun, C.-D.; Liu, J.-H.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Springer, T. & Wang, J.-H. (2004): Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface, *Mol. Cell* **14**, 269–276.
- Yokosuka, T.; Sakata-Sogawa, K.; Kobayashi, W.; Hiroshima, M.; Hashimoto-Tane, A.; Tokunaga, M.; Dustin, M. & Saito, T. (2005): Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76, *Nat Immunol* **6**, 1253–1262.
- Young, J.; Cheadle, C.; Foulke, J.; Drohan, W. & Sarver, N. (1988): Utilization of an Epstein-Barr virus replicon as a eukaryotic expression vector, *Gene* **62**, 171–185.
- Yu, C.-H.; Wu, H.-J.; Kaizuka, Y.; Vale, R. & Groves, J. (2010): Altered actin centripetal retrograde flow in physically restricted immunological synapses, *PLoS One* **5**, e11878.
- Yudushkin, I. & Vale, R. (2010): Imaging T-cell receptor activation reveals accumulation of tyrosine-phosphorylated CD3zeta in the endosomal compartment, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Zal, T.; Zal, M. & Nicholas R J Gascoigne (2002): Inhibition of T cell receptor-coreceptor interactions by antagonist ligands visualized by live FRET imaging of the T-hybridoma immunological synapse, *Immunity* **16**, 521–534.
- Zeng, G.; Chen, J.; Zhong, L.; Wang, R.; Jiang, L.; Cai, J.; Yan, L.; Huang, D.; Chen, C. & Chen, Z. (2009): NSOM- and AFM-based nanotechnology elucidates nano-structural and atomic-force features of a *Y. pestis* V immunogen-containing particle vaccine capable of eliciting robust response, *Proteomics* **9**, 1538–1547.
- Zhang, H.; Cordoba, S.-P.; Dushek, O. & van der Merwe, P. (2011): Basic residues in the T-cell receptor zeta cytoplasmic domain mediate membrane

association and modulate signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19323–19328.

Zhu, Y.; Gumlaw, N.; Karman, J.; Zhao, H.; Zhang, J.; Jiang, J.-L.; Maniatis, P.; Edling, A.; Chuang, W.-L. & Siegel, C.; Shayman, J.; Kaplan, J.; Jiang, C.; Cheng, S. (2011): Lowering glycosphingolipid levels in CD4⁺ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage, *J Biol Chem* **286**, 14787-14794.

Zilly, F.; Halemani, N.; Walrafen, D.; Spitta, L.; Schreiber, A.; Jahn, R. & Lang, T. (2011): Ca²⁺ induces clustering of membrane proteins in the plasma membrane via electrostatic interactions, *EMBO J.* **30**, 1209–1220.

Zou, X.; Gao, Y.; Ruvolo, V.; Gardner, T.; Ruvolo, P. & Brown, R. (2011): Human glycolipid transfer protein gene (GLTP) expression is regulated by Sp1 and Sp3: involvement of the bioactive sphingolipid ceramide, *J. Biol. Chem.* **286**, 1301–1311.

8 Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Lang bedanken, der es mir als mein Doktorvater und Erstgutachter möglich gemacht hat, diese Doktorarbeit durchzuführen. Dabei möchte ich ihm besonders für Bereitstellung dieses interessanten Themas, für das Lehren genauer wissenschaftlicher Herangehensweisen, für die Vermittlung der guten wissenschaftlichen Praxis, für die konstruktiven Diskussionen, kurzum für seine durchgehende Unterstützung meiner gesamten Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Thiele für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Leitung der mich unterstützenden Forschungsschule bedanken. Herrn Prof. Dr. Waldemar Kolanus danke ich als fachnahe Prüfer und dafür, dass er durch seine Vorschläge an der Themenfindung dieser Doktorarbeit beteiligt war und uns kollegial mit seiner Arbeitsgruppe mittels Raumangebot, Infrastruktur und Know-How unterstützt hat. Als fachfremdem Prüfer möchte ich Herrn Prof. Dr. Klemens Rottner danken.

Für die finanzielle Unterstützung und für die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts möchte ich der „NRW International Graduate Research School LIMES - Chemical Biology“ danken, die vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes NRW finanziert wird.

Ich möchte dem LIMES-Institut mit seinen Verantwortlichen und Mitarbeitern danken, durch die ich in dieser Arbeitsstelle nicht nur hervorragend forschen, sondern auch viele persönliche Freunde finden konnte.

Dankbarkeit, Verbundenheit und Freundschaft verbinden mich mit den Mitgliedern und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Lang, wegen denen ich auch in schwierigen Zeiten gerne ins Labor gekommen bin und die mich persönlich und fachlich unterstützten. In diesem Zuge möchte ich auch die

Arbeitsgruppe Kolanus erwähnen, die unsere Arbeitsgruppe zu Beginn meiner Doktorarbeit herzlich aufgenommen hat und die uns offen und freundlich zur Seite standen und uns bei unserem Weg in ein eigenes Labor über die Grenzen kollegialer Zusammenarbeit half.

Besonders danke ich Elisa Merklinger und Gerrit Loch für die Beratungen, Korrekturen und mentale Unterstützung bei der Anfertigung dieser schriftlichen Arbeit und während der restlichen Doktorarbeit.

Als Letztes - aber nicht weniger wichtig - danke ich meinen Eltern Claudia und Jochen van Üüm, meiner Schwester Maïke van Üüm, sowie dem Rest meiner Familie und allen meinen Freunden, dass sie mich sowohl während der Zeit meiner Promotion wie auch in meinem sonstigen Leben immer bedingungslos unterstützt haben.

.

9 Anhang

Betreff:Re: IS on supported lipid bilayers

Datum:Tue, 20 Nov 2012 13:13:12 +0000

Von:Dustin, Michael <Michael.Dustin@med.nyu.edu>

An:Thorsten Lang <thorsten.lang@uni-bonn.de>

Hi,

Your images look at bit like the TH2 cell synapse described by Parker. There seems to be a problem with central movement of LFA-1 and ICAM-1 clusters after they form in the interface. You are using Jurkat cells? What I recommend is starting with primary T cell blasts. "Jurkat" has undergone a lot of drift and many Jurkat sublines have very low LFA-1 expression, which is just one of the possible problems. There are some sub-lines that work to form SMACs, but not all. Also, your protocol for biotinylation of the anti-CD3 needs to be designed to generate a very low level of biotinylation (10% biotinylated). Your mobility looks OK, but will have issues over time if the anti-CD3 is multibiotinylated. It also looks like some cells are displacing the bilayer. This may indicate some large defects that may also limit mobility. Are you cleaning glass with Acid Piranha solution? This is a bit dangerous if you have organic solvents around due to consequences of accidental mixing, but is the most consistent method we have found. All other methods require hard to specify rinse time and are more likely to fail. Let me know if you want to discuss any of these issues.

Cheers,
Mike

On 11/20/12 6:59 AM, "Thorsten Lang" <thorsten.lang@uni-bonn.de> wrote:

>Dear Dr. Dustin,

>

>We have tried to establish the assay published recently in PNAS (see attached). We can

>produce supported lipid bilayers that have exactly the same biophysical properties as

>published but we see never a pSMAC and rarely a cSMAC. Can you help us? My student

>Jan van Üüm tried now more than 1 1/2 year, but there is no progress.

>

>Best wishes,

>Thorsten Lang